

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1967 - N° 529

TITRE DE LA THÈSE

ÉTUDE DE LA STRUCTURE DE CERTAINS
ENTÉROVIRUS (ECHOvirus 3, 6, 7, 11, 12
ET COXSACKIE B 4) PAR CHROMATOGRAPHIE
SUR PHOSPHATE DE CALCIUM

Travail du Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Immunologie.
(Professeur R. SOHIER)

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de LYON

le 9 Janvier 1967

par

M. Moncef JEDDI

Ancien Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Lyon
Diplômé d'Hématologie, Parasitologie, Sérologie

né le 12 Août 1935

à MONASTIR (Tunisie)

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1967 - N° 529

TITRE DE LA THÈSE

ÉTUDE DE LA STRUCTURE DE CERTAINS
ENTÉROVIRUS (ECHOvirus 3, 6, 7, 11, 12
ET COXSACKIE B 4) PAR CHROMATOGRAPHIE
SUR PHOSPHATE DE CALCIUM

Travail du Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Immunologie.
(Professeur R. SOHIER)

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de LYON

le 9 Janvier 1967

par

M. Moncef JEDDI

Ancien Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Lyon
Diplômé d'Hématologie, Parasitologie, Sérologie

né le 12 Août 1935

à MONASTIR (Tunisie)

FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens Honoraires :

M. J. LEPINE - Membre de l'Institut
M. H. HERMANN - Correspondant de l'Institut

Doyen :

M. J. F. CIER

Assesseurs :

M. M. LEVRAT
M. J. DORCHE

Conseiller Administratif :

M. H. PRUVOST

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PATEL - LEPINE - TRILLAT - GARIN - GATE - MARTIN - GABRIELLE
SANTY - DUCLOS - GUILLEMINET - HERMANN - ROCHET - POLLOSSON -
ENSELME - WERTHEIMER - SARROUY

PROFESSEURS

MM. J. CIBERT	Clinique Urologique
P. PONTIUS	Physique Biologique
(détaché à Beyrouth)	
M. CHAMON	Chimie organique et Toxicologie
F. PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
R. FROMENT	Clinique et Prophylaxie cardio-vasculaires
P. CROIZAT	Clinique médicale C
P. MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
L. REVOL	Pharmacie galénique
H. PIGEAUD	Clinique obstétricale
J. BOURRET	Médecine du Travail
M. LEVRAT	Clinique médicale A
R. SOHIER	Bactériologie
G. NETIEN	Botanique et cryptogamie
P. BERTRAND	Clinique chirurgicale C
A. BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
B. DREVON	Pharmacie chimique et Pharmacologie
L. ROCHE	Médecine légale et Déontologie
J. COUDERT	Parasitologie et Pathologie exotique

MM. P. MOUNIER-KUHN
 L. PAUFIQUE
 H. THIERS
 J. BRUN
 J. CREYSSSEL
 M. DARGENT
 M. BERGER (1)
 A. GUICHARD
 P. GIRARD
 M. GIRARD
 M. LATARJET
 R. PEYCELON
 A. VACHON
 P. GALY
 J. PAPILLON
 M. JEUNE
 A. GONIN
 P. MONNET
 J. CHATONNET
 P. GUINET
 H. COLLET (1)
 A. TRILLAT
 Ch. FREIDEL
 J. MARION
 J. DORCHE
 L. MANSUY (1)
 L. REVOL (1)
 J. LECUIRE (1)
 H. LIARAS (1)
 L. PERROT
 J.F. CIER
 J. PERRIN
 P. GOINARD (1)

 P. MICHAUD
 M. PONT (1)
 J. TRAEGER (1)
 J. MATHIEU
 G. FAUCON
 A. BERTOYE
 G. VIGNON
 D. VINCENT
 A. CIER
 L. COLOBERT
 X.....
 X.....
 X.....
 X.....
 X.....

Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie et d'Audiophonologie
 Clinique Ophtalmologique
 Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie et Allergologie
 Clinique de Pneumophtisiologie
 Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique
 Clinique carcinologique
 Physique nucléaire appliquée à la Médecine
 Anatomie pathologique
 Pathologie générale et expérimentale
 Clinique médicale D
 Anatomie
 Clinique chirurgicale B
 Pathologie médicale
 Physio-pathologie des voies respiratoires
 Radiologie
 Clinique médicale infantile et Hygiène du 1er âge
 Thérapeutique
 Clinique médicale infantile B
 Physiologie B
 Clinique endocrinologique
 Chimie générale et pharmaceutique
 Clinique de Chirurgie orthopédique
 Clinique stomatologique
 Clinique de Chirurgie et d'Orthopédie infantiles
 Matière médicale et Législation pharmaceutique
 Neurochirurgie
 Hématologie
 Neurochirurgie
 Clinique chirurgicale propédeutique
 Chimie
 Physiologie A
 Thérapeutique chirurgicale et Chirurgie opératoire
 Clinique thérapeutique chirurgicale et chirurgie expérimentale
 Clinique de Chirurgie cardiaque
 Médecine générale
 Pathologie métabolique et rénale
 Clinique gynécologique
 Biologie médicale et Pharmacodynamie
 Clinique des Maladies infectieuses
 Hydrologie thérapeutique, climatologie et Ecologie sociale
 Biochimie appliquée
 Pharmacodynamie
 Chimie biologique et médicale
 Pathologie chirurgicale
 Histologie et Embryologie
 Clinique Neuro-psychiatrique et d'Hygiène mentale
 Physiologie et Pathologie obstétricales
 Hygiène et Action sanitaire et sociale

(1) Professeurs à titre personnel.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	ROMAN	Parasitologie
	FEROLDI	Anatomie pathologique
	MORET	Physique biologique
	ODDOUX	Botanique et cryptogamie
	de SOLLIERS	Chimie analytique
	DES PIERRES	Médecine générale
	GARIN	Parasitologie
	TOLOT	Médecine du Travail
	THIVOLET	Hygiène
	MALLEIN	Chimie analytique
	PINET	Electro-radiologie
	COLOMB	Dermatologie

MAITRE DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

MM.	CREYSSEL R.	Chimie biologique
	GUYOTAT	Neuro-psychiatrie
	DESCOTES	Chirurgie générale
	JOUVET	Pathologie expérimentale
	PEYRIN	Physique biologique
	TOMMASI	Anatomie pathologique
	BUFFARD	Electro-radiologie
	LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
	de MOURGUES Fr.	Stomatologie
	NAUSSAC	Maladies infectieuses
	REBOUILLAT	Chirurgie générale
	ROMAGNY	Pédiatrie
	DELAHAYE	Médecine générale
	DELEUZE	Anesthésiologie
	GIRAUD	Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique
	MICHEL	Anesthésiologie
	FRANCOIS	Pédiatrie et Puériculture
	MICHOULIER	Chirurgie générale
	LAMBERT	Médecine générale
	FRIES	Médecine générale
	GILLY	Pédiatrie
	ROBERT	Médecine générale
	BOUCHET	Anatomie
	BETHENOD	Pédiatrie
	GERMAIN	Immunologie, sérologie, hématologie
	KALB	Pneumo-phtisiologie
	LARBRE	Pédiatrie
	SOUSTELLE	Chirurgie générale
	VIALA	Médecine générale
	VINCENT	Bactériologie, parasitologie, virologie
	GIROD	Histologie et embryologie
	GRAS	Chimie biologique

MM.	COLIN	Médecine légale
	BERTRAND	Chimie biologique
	MARET	Chirurgie générale
	VIALLIER-RAYNARD	Bactériologie
	CHOLLAT	Electro-radiologie
	FLEURETTE	Bactériologie
	FLANDROIS	Physiologie
	MOREL	Hématologie
	TERMET	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
	FREDERICH	Pharmacologie
	DAUDET	Chirurgie infantile
	BRUNE	Médecine générale et Thérapeutique
	LOMBARD-PLATET	Chirurgie générale
	BOUVIER	Rhumatologie
	FREYCON	Pédiatrie
	LA PRAS	Neuro-chirurgie
	PELLET	Physiologie
	DUQUESNEL	Electroradiologie
	DEJOUR	Orthopédie et Traumatologie
	MOULIN	Dermato-Vénérologie
	PERRIN-FAYOLLE	Pneumo-phtisiologie
	PALIARD	Médecine générale et Thérapeutique
	MORGON	O.R.L.
	PAUPERT-RAVAULT M.	Ophtalmologie
	MOTIN	Anesthésiologie
	PASQUIER	Médecine générale et Thérapeutique
	VAUZELLE	Anatomie pathologique
	CZYBA	Histologie et Embryologie
	CABANAC	Physiologie
	TOURAINE	Pneumo-phtisiologie
	BEL	Médecine générale et Thérapeutique
	CHARVET	Gynécologie obstétrique
	MAYER	Cancérologie
	SISTERON	Chirurgie thoracique et Cardio-vasculaire
	BRAILLON	Anatomie et Chirurgie générale
	VILLIERS	Chirurgie générale
	LOUISOT	Chimie biologique
	COURJON J.A.	Neuro-psychiatrie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

MM.	FAVRE-GILLY	Hématologie
	RIFFAT	Hygiène
	ROLLET	Pharmacie galénique
	BIZOLLON	Physique

AGREGES EN EXERCICE

MM.	BONAMOUR	Ophtalmologie
	FRANCILLON	Chirurgie générale
	NOTTER	Gynécologie obstétricale
	de MOURGUES G.	Chirurgie générale
	DUMONT Martial	Obstétrique
	SCHOTT	Neuro-psychiatrie
	DEVIC	Médecine générale
	SAUBIER	Chirurgie générale
	DURAND	Urologie
	HUGONNIER	Ophtalmologie
	ALLEGRE	Neuro-chirurgie
	GARDE	Médecine générale
	FAYSSE	Orthopédie
	GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie
	PERRIN André	Médecine générale
	NORMAND	Médecine générale
	MOUNIER-KUHN Alain	Chirurgie générale
	MORNEX	Médecine générale
	CHASSARD	Electro-radiologie
	GARNIER	Obstétrique
	DUMAS	Stomatologie
	SCHNEPP	Orthopédie
	NOEL	Médecine générale

Examineurs de la Thèse :

- Président : M. le Professeur R. SOHIER
- Assesseurs: MM. J. DORCHE
L. PERROT
FLEURETTE

A mes parents,

Ils ont toujours été pour nous un exemple par leur amour pour le travail. Ils ont tout sacrifié pour leurs enfants, si ce modeste travail leur montre que leurs sacrifices n'ont pas été vains nous en serons réconfortés.

A ma femme,

Elle nous a toujours aidé tout au long de nos études. La poursuite de ce travail lui a imposé de grands sacrifices qu'elle a toujours accepté avec enthousiasme, nous encourageant ainsi à poursuivre nos efforts.

Nous lui dédions ce travail.

à notre fils,

Quand il sera en âge de lire ces pages, ce travail sera complètement oublié et périmé. Que lui au moins ne déçoive pas mes espoirs.

à mes frères,

à ma soeur,

Auxquels je souhaite un brillant avenir. Avec toute mon affection.

à tous les miens,

En témoignage de mon affection.

à tous mes amis.

AVANT - PROPOS

Nous voulons remercier ici Messieurs les professeurs qui ont bien voulu accepter de juger notre travail, ainsi que tous ceux qui ont contribué à sa réalisation.

Monsieur le Professeur S O H I E R a inspiré ce travail. Il est difficile d'exprimer en peu de mots tout ce que nous lui devons.

Il nous a d'emblée accordé sa confiance en acceptant de nous compter parmi ses collaborateurs, il n'a jamais cessé de nous soutenir dans tous les domaines. Son laboratoire porte les marques de ses qualités de patience, d'amour pour le travail bien fait, et de rigueur scientifique, qualités qu'il a su insuffler à tous ses collaborateurs. Nous considérons comme un privilège de travailler à ses côtés.

C'est dans le service de Monsieur le Professeur D O R C H E à l'Hôpital de la Croix-Rousse que nous avons réellement pris conscience de l'intérêt du travail de laboratoire. Il n'a cessé durant notre internat de nous manifester sa bienveillance. Nous l'assurons de notre réelle reconnaissance.

Durant les deux semestres que nous avons passés à l'Hôtel Dieu, Monsieur le Professeur P E R R O T nous a toujours manifesté une réelle bienveillance. Nous gardons de lui le souvenir d'un homme affable qui sait guider ses collaborateurs dans une atmosphère cordiale. Nous voulons lui manifester notre sincère attachement.

Monsieur le Professeur F L E U R E T T E a très aimablement accepté de siéger au jury. Nous sommes très sensible à l'honneur qu'il veut bien nous faire et le prions de croire à notre profond respect.

Si ce travail est présenté par nous seuls, il n'en est pas moins vrai que sa réalisation n'est pas due à nos uniques efforts. Nous avons trouvé dans le laboratoire de Monsieur le Professeur SOHIER une équipe jeune, dynamique, travaillant au coude à coude. Ce travail n'est qu'un aspect des efforts de cette équipe où nous sommes tous tributaires les uns des autres. C'est uniquement grâce à la collaboration de tous que ce travail a pu être réalisé.

C'est Madame le Docteur GAUDIN qui nous initia à la virologie. L'étendue de son savoir et la clarté de sa pensée ont toujours été pour nous d'un précieux secours. C'est elle qui nous a guidé et au besoin encouragé tout au long de ce travail. Nous avons toujours trouvé auprès d'elle une grande compréhension. L'atmosphère de parfaite entente dans laquelle nous avons collaboré n'est pas pour peu dans la réalisation de ce travail qui est autant le sien que le nôtre. Nous ne savons comment lui exprimer nos remerciements pour tout ce qu'elle a fait pour nous.

C'est pendant les quatre années d'internat que nous nous sommes initiés aux techniques de laboratoire, guidés par des maîtres qui veillaient autant sur notre formation que sur la qualité de notre travail. Ils nous ont inculqué les notions de rigueur dans l'analyse et d'honnêteté intellectuelle dans la rédaction des résultats de notre travail. Cette période nous a marqué à tout jamais, nous lui devons notre orientation. Nous voulons exprimer ici notre profonde reconnaissance à tous ceux qui nous ont permis de profiter de cet enseignement d'une valeur exceptionnelle.

Nous exprimons notre gratitude à nos maîtres : Monsieur le Professeur CHAMBON, Monsieur le Professeur MALLEIN, Messieurs BIGOT, MONNET, QUINCY et A. REVOL qui nous ont guidé pendant notre internat.

INTRODUCTION

Les entérovirus font partie d'un plus vaste ensemble réunissant sous le terme de nanivirus ⁽¹⁾ (ANDREWS, 1962) ou encore de picornavirus ⁽²⁾ (MELNICK et le Comité des Entérovirus 1962, 1963) des virus de petite taille dont l'acide nucléique infectieux est un acide ribonucléique. Les picornavirus sont divisés en deux groupes :

- les entérovirus : poliovirus, virus Cocksackie, virus ECHO.
- les rhinovirus.

Les entérovirus ont plusieurs propriétés physico-chimiques communes dont les plus importantes sont les suivantes :

- leur acide nucléique est l'acide ribonucléique qui représente la particule infectieuse,
- leur taille est comprise entre 20 et 30 m μ
- la partie virale ne possède pas de lipides essentiels à son pouvoir infectieux qui n'est pas influencé par un traitement à l'éther ou par divers détergents,
- la particule ne possède pas d'enveloppe : ce sont des virus "nus",
- la particule infectieuse est stabilisée vis-à-vis des variations de température par les ions métalliques bivalents, notamment l'ion Mg⁺⁺ (WALLIS et MELNICK, 1962).

(1) de Nanus = nain

(2) de pico = tout petit et RNA = forme anglosaxonne de ARN

- une autre propriété remarquable est la stabilité des entérovirus à pH 3,0 (KETLER, 1962), cette dernière propriété oppose les entérovirus aux rhinovirus qui ne possèdent pas cette propriété (TYRELL, 1963)

Les Entérovirus forment ainsi un groupe assez homogène, mais si on soumet ce groupe à une analyse, non pas physico-chimique mais biologique, une plus grande hétérogénéité apparaît.

En fait de grandes différences existent entre les poliovirus, les virus Coxsackie et les virus ECHO. Ainsi les poliovirus provoquent des lésions des neurones tandis que les autres entérovirus lorsqu'ils atteignent le système nerveux central ne lèsent presque toujours que les cellules interstitielles, ce qui a comme conséquence la rareté des séquelles nerveuses ; de même seuls les virus Coxsackie sont pathogènes pour le souriceau nouveau-né.

Tous les Entérovirus n'ont pas la même affinité pour les différents systèmes cellulaires. Ainsi si les poliovirus ont une affinité pour plusieurs systèmes cellulaires (cellules de rein de singe, cellules amniotiques, cellules diploïdes humaines, lignée Hep2), les virus ECHO et les virus Coxsackie B ont une affinité moins large (rein de singe, cellules amniotiques). Quant aux virus Coxsackie A, ils se développent très bien sur le souriceau nouveau-né.

Des techniques d'analyses particulières font même apparaître des différences d'un type à l'autre et même entre deux souches d'un même type. On a même pu, comme nous le verrons ci-après, séparer à partir d'une même souche des particules virales dont le comportement diffère dans telle ou telle condition expérimentale ou spontanée.

C'est à l'occasion de l'utilisation des vaccins vivants pour la prévention de la poliomyélite qu'on a étudié les différences antigéniques entre les diverses souches poliomyélitiques. Ces études ont mis l'accent sur l'étude antigénique des différents entérovirus.

L'utilisation des vaccins vivants pour la prévention de la poliomyélite a eu pour effet de mettre en circulation un nombre croissant de virus poliomyélitiques dits "atténués" ou "avirulents" dont les caractères varient notablement de ceux des souches sauvages dont ils sont issus. Depuis les premières publications relatives à ce problème (VOGT , 1957) et leur application à une tentative de différenciation des différents sous-types des poliovirus (WENNER, 1956) nombre de travaux ont été consacrés à cette question dont la portée pratique est évidemment très importante.

Les travaux de WENNER (1959) et de DE DUBES (1959) ont très tôt attiré l'attention sur les variations antigéniques survenant à l'intérieur d'un type.

Dans le groupe des techniques basées sur les caractères physico-chimiques des poliovirus, nous disposons des tests suivants dont nous donnons succinctement le principe et la technique.

Marqueur d (HSIUNG, 1958) (VOGT , 1957)

On étudie la formation des plages par la souche considérée sous deux milieux gélosés à pH différents. La technique est celle décrite dans la partie "Matériel et Méthodes". On travaille généralement avec 4 bouteilles, deux sont recouvertes d'un milieu gélosé "acide" contenant 11 p.100 de NaHCO_3 ; deux autres sont recouvertes d'un milieu "alcalin" contenant 0,27 à 0,30 p.100 de NaHCO_3 .

Les souches d+ donnent le même nombre de plages dans les deux milieux. Par contre, la formation des plages par les souches d⁻ est inhibée (d = delayed) ou retardée sous milieu acide.

Marqueur Ms (KANDA, 1959)

On étudie la production de plages sur une lignée continue de rein de singe (lignée MS). Le milieu de couverture contient 0,25 p.100 de NaHCO_3 .

Les souches MS^+ produisent des plages de 3 à 5 mm de diamètre et ont un titre très élevé ($> 10^7$ P.F.U.)⁽¹⁾.

Les souches MS^- ont des plages d'un diamètre inférieur à 1 mm et des titres faibles (moins de 10^6 P.F.U. / ml) ou même ne forment aucune plage.

Marqueur T (LWOFF, 1959 ; LWOFF et coll., 1959 ; SABIN et coll., 1960).

On prépare des dilutions logarithmiques du virus à étudier (poliovirus type 1). On inocule 4 tubes de cellules rénales de singe avec 0,1 ml de chaque dilution, de façon à réaliser un titrage du virus, chaque lot de tubes est divisé en deux ; deux tubes de chaque dilution sont inoculés à $+37^\circ\text{C}$ et deux autres à 40°C pour les types 1 et 2, et à $40,2^\circ\text{C}$ pour le type 3. Après 7 jours d'incubation on calcule les titres obtenus pour chaque souche et à chaque température.

Les souches T^- (ou encore rct / 40^-) ont un titre à 40°C qui est inférieur d'au moins 4 log à leur titre à 37°C ; elles sont dites "froides" ; les souches T^+ (ou encore rct / 40^+) ont une différence de titre qui ne doit pas être supérieure à 2 log. Elles sont dites "chaudes".

Marqueur A (WALLIS et coll., 1962)

Le virus à éprouver (type 1) est dilué au 1/2 dans une solution de $AlCl_3$ à 0,25 mM (concentration finale 12,5 mM). L'échantillon est divisé en deux parties ; l'une gardée à $+4^\circ\text{C}$ jusqu'à son utilisation, l'autre est chauffée à 50°C pendant 15 minutes. On titre ensuite les deux échantillons par la méthode des plages.

On peut aussi déterminer une souche dite A^- (thermostabilisée par Al^{+++}) et une souche dite A^+ (inactivée). On peut ainsi déterminer des souches "intermédiaires".

(1) - P.F.U. : Plaque Forming unit ou nombre d'unités virales provoquant l'apparition des plages.

Marqueur Aa (WALLIS et coll., 1963)

On prépare la solution BPBS :

NaCl	8	g
KCl	0,4	g
Na ₂ H Po ₄	0,06	g
KH ₂ Po ₄	0,06	g
Na H Co ₂	2,2	g
Eau bidistillée	q.s.p	1 litre.

Diluer le virus (type 1) préalablement titré dans la solution BPBS de façon à contenir 10^4 P.F.U. / ml. A 2,7 ml de virus ainsi dilué on ajoute 0,3 ml d'une solution de $AlCl_3$ 50 mM (concentration finale 5 mM). Dans un témoin remplacer $AlCl_3$ par 0,3 ml d'eau distillée. Mélanger par retournement des tubes. Incuber à 37°C pendant 13 minutes. Centrifuger la précipité formé à 2.000 tours pendant 5 minutes, diluer le surnageant au 1/10 ; titrer par la méthode des plages à raison de 0,1 ml par boîte. Le tube témoin est dilué au 1/30 et inoculé dans les mêmes conditions. On lit après 48 heures.

Les contrôles contiennent, au stade de la lecture, 30 à 40 plages par bouteille. Si les cultures du surnageant montrent plus de 50 plages, la souche est dite Aa^+ car les particules virales n'ont pas été adsorbées sur le précipité. Si moins de 10 plages sont repérés la souche est Aa^- car les particules virales ont été adsorbées sur le précipité. Entre 10 et 50 plages la souche est dite "intermédiaire".

Cette technique n'est pas utilisable actuellement pour les types 2 et 3, elle est basée sur le même principe que la marqueur E.

Marqueur E

Son principe réside dans l'étude de l'évolution du virus adsorbé sur une colonne de Diéthylaminoéthylcellulose (DEAE) (HODES, 1960), de $Al(OH)_3$ (WOODS, 1961), de cellulose (HOLLINSHEAD, 1960) par un tampon phosphate.

Alors que l'élution permet de retrouver 90 p.100 d'une souche virulente (souche MAHONEY), 0,1 p. 100 seulement d'un virus atténué peut ainsi être récupéré dans l'éluat (souche Lsc 2 ab).

Marqueur Cy

On étudie la formation de plages sur un milieu de couverture contenant une faible concentration de cystine (concentration finale 0,1 mM) ou une forte concentration (concentration finale 2,0 mM (Mc BRIDE, 1962)).

Les faibles concentrations de cystine inhibent la formation des plages par les souches virulentes (Cy^+) alors que les mutants atténués ne sont plus influencés par cet aminoacide (Cy^-).

L'étude des différents marqueurs génétiques précédents a montré l'existence possible de souches de type intermédiaire ayant subi une mutation génétique, souches ayant des caractères de transition entre les souches parentes (vaccin) et les souches naturelles (sauvages).

Bien que les données soient plus succinctes, il se passe la même chose pour les autres entérovirus.

a) Dans une étude sur 153 souches d'ECHO 6 isolées dans une épidémie de méningite, BARRON et coll. (1965) ont décrit la présence de deux variétés de virus. L'une donne de grandes plages appelées m^+ , l'autre de petites plages m (minute plage). En ajoutant de la protamine au milieu de couverture, les souches m donnent alors de grandes plages.

Des lapins immunisés par les variétés m et m^+ réagissent de la même façon, mais avec m^+ on obtient des sérums à faible titre et des titres forts avec m .

Les mêmes auteurs ont remarqué que différentes souches d'ECHO types 2, 3, 5, 6, 9 donnent de petites plages ; l'addition de protamine au milieu de couverture provoque l'apparition de grandes plages avec ces mêmes souches.

b) SUTO (1965, a) continuant les études sur les souches précédentes, a montré qu'après 1 à 11 passages successifs trois des six souches étudiées passèrent de la forme m^+ à la forme m .

Les trois autres souches restèrent stables après 20 à 29 passages.

La culture d'un mélange artificiel des deux formes m et m^+ montre que la forme m se développe mieux que la forme m^+ .

Pour ces auteurs la forme m^+ semble être celle qu'on trouve le plus souvent dans les selles. SUTO et coll. (1965, b) ont montré que la forme m^+ avait un titre plus faible et un effet cytopathogène réduit quand on fait les cultures sur cellules de rein de singe macacus rhésus (culture primaire), cercopithecus aethiops (lignée continue) ; par contre, les titres obtenus sont plus élevés en cellules amniotiques.

c) Plusieurs auteurs ont étudié l'hémagglutinine des virus ECHO ; il est apparu ainsi, comme le rapportent GAUDIN et coll. (1963), que certains types de virus ECHO sont capables d'agglutiner les hématies humaines O (types 3, 6, 7, 11, 12, 19, 20, 21, 29), certains le sont vis-à-vis des hématies de singe : erythrocebus patas pour les types 7 et 12 et cercopithecus aethiops pour les mêmes types. Les mêmes auteurs ont montré que les récepteurs érythrocytaires ne semblent pas détruits lors de la fixation d'un virus ECHO (type 7) puisque les hématies sont capables de fixer secondairement soit un virus de même type, soit un virus d'un autre type.

Les mêmes auteurs ont aussi montré que pour obtenir le maximum d'hémagglutinine sur cellules de rein de singe, il est opportun d'inoculer les cultures avec la quantité de virus minimale capable de faire apparaître un effet cytopathogène. Ils ont aussi montré que les hémagglutinines des virus ECHO de type 6 sont particulièrement labiles et susceptibles de disparaître après un nombre de repiquages assez faible.

d) D'autres différences entre des souches d'un même type ont encore attiré l'attention :

Ainsi, étudiant les deux souches prototypes d'ECHO 4, la souche DUTOIT et la souche PESACEK, qui diffèrent par leur capacité de séroneutralisation, WALLIS et MELNICK (1965) ont montré que l'addition de cystine donne

une augmentation du nombre et de la taille des plages pour la souche PESACEK, la cystine n'a par contre aucun effet sur la souche DUTOIT, mais elle est sensible au chlorure de magnésium, au sulfate de dextran, au sulfate de protamine, au diéthyl amino dextran qui provoquent une augmentation de la taille des plages.

Les mêmes auteurs ont montré que l'addition de cystine stabilise la souche PESACEK à 50°C alors que cette action n'est pas retrouvée pour la souche DUTOIT ainsi que pour 41 autres entérovirus (28 ECHO, 7 Coxsackies, 6 Poliovirus).

Par ailleurs, les deux souches DUTOIT et PASACEK ont des propriétés de surface différentes. La souche PESACEK se fixe sur les résines échangeuses d'ions alors que la souche DUTOIT ne se fixe pas. Mais la souche PESACEK est hétérogène car toutes les particules infectieuses ne se fixent pas sur la résine, celles qui ne se fixent pas produisent des particules qui, elles non plus, ne se fixent pas.

e) SIMON et DOMÖK (1963) ont étudié la souche ECHO 6. Sur dix souches ECHO 6 isolées par les auteurs, trois se sont révélées hémagglutinantes. Le comportement d'une des trois souches hémagglutinantes a fait penser aux auteurs que cette souche est composée d'un mélange de particules hémagglutinantes et de particules non hémagglutinantes. Les auteurs ont confirmé cela par la chromatographie de cette souche sur colonne de phosphate de calcium, ainsi que par l'adsorption par les globules rouges. Les particules hémagglutinantes n'éluent pas à la même concentration que les particules non hémagglutinantes.

Plusieurs autres auteurs ont montré l'hétérogénéité d'une même souche.

f) Ainsi, CHOPPIN et EGGERS (1962) ont étudié une souche de Coxsackie B4 à partir de laquelle ils ont séparé deux variétés différentes appelées aⁱ et a^s. La variété a^s est plus sensible aux anticorps spécifiques ; elle est aussi sensible à un inhibiteur se trouvant dans l'agar et a provoqué la formation de petites plages. Par contre, la variété aⁱ est relativement moins sensible aux anticorps spécifiques, insensible à l'inhibiteur de l'agar et

provoque la formation de grandes plages. L'addition de diéthyl amino éthyl dextran à l'agar élimine l'action de l'inhibiteur pour la variété a^s qui dans ces conditions provoque la formation de grandes plages.

D'autre part, la variété a^u s'adsorbe plus vite sur les cellules en culture et provoque leur destruction plus complètement et plus rapidement que la variété aⁱ.

Toutes ces différences dans le comportement de ces deux variétés sont stables et se retrouvent après plusieurs passages.

g) Dans une étude sur ^{une} souche d'ECHO 12, HALPEREN et coll. (1964) ont montré que la culture de virus ECHO 12 provoque l'apparition de deux hémagglutinines de façon simultanée. Ces deux hémagglutinines diffèrent par leur gradient de densité mais sont similaires par leur constitution antigénique et leur adsorption aussi bien par les cellules de rein de singe en culture que par les globules rouges.

Par examen en microscopie électronique l'auteur a vérifié que les particules ayant une densité de 1,33 représentent une particule virale complète alors que celles de densité 1,29 sont non infectieuses. Le pouvoir hémagglutinant des particules vides est plus stable à la chaleur et au traitement par l'éther que celui des particules pleines (ou entières).

Telles étaient les données concernant l'hétérogénéité du groupe des entérovirus au moment où nous avons entrepris ce travail.

Nous avons voulu étudier les différences de comportement de certains types de virus ECHO et de virus Coxsackie. Nous nous sommes attachés à étudier particulièrement leur propriété hémagglutinante.

Pour cela nous avons eu recours à une méthode assez aisément réalisable : la chromatographie sur colonne de phosphate de calcium car nous pensons que les différents lots que nous avons préparés au cours de ce travail nous donnent des résultats reproductibles. D'autre part, ce produit peut être fabriqué, à la demande, par n'importe quel laboratoire.

C H A P I T R E I

MATERIEL ET METHODES

Nous grouperons dans cette partie les techniques que nous avons utilisées tout au long de notre travail.

I - CULTURE DE TISSU

Nous avons utilisé des cultures primaires de tissu rénal de singe (Macacus irus). Le milieu de croissance consiste en hydrolysate de lactalbumine à 0,5% en milieu de HANKS additionné de 2% de sérum de veau inactivé (MELNICK, 1952 ; LAHELLE, 1956). Comme milieu de survie nous avons utilisé le milieu 199 de PARKER.

II - PREPARATION DES ANTIGENES

Les antigènes utilisés ont tous été préparés sur culture primaire de tissu rénal de singe (Macacus irus). L'inoculation est faite généralement après sept à dix jours de croissance.

Avant l'inoculation, on rejette le milieu de croissance et on le remplace par la solution de PARKER. Le virus est inoculé sous volume de 0,1 ml à une dilution qui provoque la dégénérescence complète de la nappe cellulaire en 5 à 6 jours à 37°C.

L'effet cytopathogène est contrôlé tous les deux jours. Une fois la dégénérescence complète obtenue on recueille l'antigène et on le place à -20°C jusqu'au moment de l'emploi.

III - TECHNIQUE DE CHROMATOGRAPHIE

Nous avons recherché une méthode simple, aisément réalisable, sans appareil coûteux, afin de permettre une analyse chromatographique d'un grand nombre de souches d'entérovirus tant prototypes que localement isolées.

La technique décrite par GORDON SMITH (1961) adaptée de celle de TAVERNE (1958) nous parut répondre à nos exigences. C'est elle, à peine modifiée, que nous avons adoptée.

1°) Choix des colonnes

Nous avons utilisé comme colonnes à chromatographie des filtres cylindriques en verre fritté de porosité zéro. Les dimensions utiles de la colonne sont de 80 x 20 mm. Ces colonnes se trouvent dans le commerce sous le nom de tube d'ALLIHN.

2°) Le support

Nous avons utilisé du phosphate de calcium préparé par nous-mêmes au laboratoire par mélange d'une solution de phosphate disodique 0,5 M et d'une solution de chlorure de calcium 0,5 M.

Le mélange des deux solutions est fait de la façon suivante :

La solution de CaCl_2 est contenue dans une ampoule à brome dont l'extrémité inférieure est munie d'une aiguille hypodermique (7-25) ce qui en permet l'écoulement goutte à goutte et de manière parfaitement reproductible d'une fois à l'autre dans la solution de $\text{Na}_2 \text{H PO}_4$; cette dernière est contenue dans un flacon placé sur un agitateur magnétique tournant à petite vitesse. Le précipité ainsi obtenu est lavé trois fois par décantation avec du tampon phosphate 0,001 M à pH 7,0. Son volume est ensuite ramené à l'aide du même tampon au volume initial de la solution de CaCl_2 ayant servi à la préparer.

La suspension de phosphate de calcium peut être utilisée après un repos de vingt quatre heures. Elle peut se conserver plusieurs jours.

3°) Protocole expérimental

La veille du jour de l'expérience la suspension de phosphate de calcium est versée dans les colonnes. La sédimentation a lieu pendant la nuit. Le lendemain l'antigène viral est versé sur la colonne très délicatement afin de ne pas casser le précipité. Comme l'antigène viral contient du rouge de phénol qui vire au jaune au contact du phosphate de calcium on peut suivre la progression du front et déterminer ainsi le volume de la colonne.

Nous avons travaillé habituellement avec des colonnes de 7 à 8 ml.

L'antigène étant ainsi fixé, l'élution se fait par passages successifs sur la colonne des solutions de $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ de molarité croissante : 0,1 M - 0,2 M - 0,3 M - 0,4 M - 0,5 M.

Dans la première partie de notre travail nous avons élué les colonnes par les différentes solutions précédentes employées sous un volume égal à celui de la colonne. Les éluats correspondants sont recueillis séparément et congelés à -20°C .

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons utilisé un collecteur de fractions. Nous avons alors élué la colonne par les différentes solutions de $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ de molarité croissante d'un volume égal au triple de son volume afin d'épuiser pour chaque solution ses possibilités d'élution. Nous avons recueilli les éluats sous volume de 20 gouttes.

4°) Techniques mises en oeuvre pour l'étude des éluats

I. Titration des particules infectieuses

Sauf exceptions indiquées dans le texte les éluats obtenus ont été titrés par la méthode des plages proposée par DULBECCO (1952).

Nous avons suivi la technique décrite dans le livre de SOHIER (1964) : on inocule avec 0,1 ml d'éluat dilué convenablement de petites bouteilles ⁽¹⁾ contenant une couche monocellulaire mais dense de cellules

(1) nous avons utilisé des flacons vendus dans le commerce sous le nom de flacons en verre normalisé de 60 ml (VN 60)

rénales de singe (Macacus irus) en culture primaire. La surface de la nappe cellulaire est d'environ 30 cm². La dilution de l'éluat est faite de telle façon que la quantité inoculée, c'est-à-dire 0,1 ml, provoque l'apparition d'une centaine de plages. L'inoculation est faite après avoir vidé les bouteilles de leur milieu de croissance. On inocule trois bouteilles par dilution. On laisse ensuite le virus s'adsorber pendant une heure à 37°C sur les cellules en agitant de temps à autre les bouteilles afin d'assurer une répartition homogène des particules infectieuses. On met alors au-dessus de la nappe cellulaire le milieu gélosé de couverture à raison de 10 ml par bouteille. Ce milieu ayant été préparé au préalable de la façon suivante :

dissoudre 3g de bactoagar DIFCO dans 170 ml d'eau bidistillée ;
 ajouter 2,5cc d'une solution aqueuse de rouge neutre à 1 pour 1000;
 stériliser à l'autoclave pendant 30 minutes à 120°C ;
 refroidir alors l'agar à 45° et ajouter :

- solution de Earle (concentrée 10 fois)	20. ml
- bicarbonate de sodium à 7,5 pour 100	10,8 ml
- lait écrémé ⁽¹⁾ (bouilli et centrifugé)	1,5 ml
- pénicilline (chlorhydrate) à 1000 000 U/ml	0,2 ml
- streptomycine (sulfate) à 200 000 U/ml	0,1 ml

Nous utilisons ainsi un milieu de couverture sans sérum mais additionné de lait (BARON, 1958).

Les bouteilles sont mises à 37°. Le titre infectieux est calculé au jour qui donne le maximum de plages (6 jours en général pour les ECHO virus et les Coxsackievirus). Le titre infectieux est exprimé en P.F.U. (Plaque Forming Unit) ou nombre d'unités virales provoquant l'apparition des plages.

Le titre en P.F.U. est calculé à partir du nombre moyen de plages observées pour une dilution donnée de virus et ramené à l'unité (le millilitre).

(1) préparation du lait écrémé : réhydrater du lait en poudre écrémé selon les indications du fabricant. Stériliser à 110°C pendant 20 minutes, conserver à +4°C. Avant utilisation, faire bouillir 10 minutes au bain-marie et centrifuger à 3000 tours pendant 20 minutes.

2. Titration du pouvoir hémagglutinant

a) les hématies

Tous les titrages ont été effectués avec des hématies humaines du groupe O Rh négatif recueillies sur la solution d'ALSEVER dont la composition est la suivante :

glucose	20	g
citrate de sodium	8	g
chlorure de sodium	4,2	g
eau distillée	q.s.p	1000 ml

Le pH de la solution est ajusté à 6,1 avec une solution d'acide citrique à 5 p. 1000 ; on stérilise par tyndalisation en chauffant à 100°C pendant 30 minutes 3 jours de suite.

Cette solution est mélangée à parties égales avec le sang au moment du prélèvement. Le sang peut être ainsi conservé à +4°C pendant une dizaine de jours.

Au moment de la réaction le mélange sang total + solution d'Alsever est centrifugé une première fois pour éliminer le plasma et la solution d'Alsever (centrifugation de 10 minutes à 3000 tours). Le culot est recueilli après décantation du surnageant puis lavé trois fois de suite de la même manière avec de l'eau salée à 8,5 p. 1000 de NaCl.

Les hématies sont enfin recueillies et mises en suspension dans la solution salée à 8,5g p. 1000. Nous avons utilisé une suspension à 0,5 p. 100.

b) Titration de l'hémagglutinine - Lecture des réactions

Nous avons utilisé des plaques à godets en matière plastique (Perspex) du type de celles utilisées par SALK (1948).

Le virus est dilué dans l'eau salée à 8,5g p. 1000. Les dilutions sont faites en progression géométrique décroissante de raison 2. Chaque godet reçoit 0,5 ml de dilution virale. On ajoute ensuite 0,5 ml de suspension de globules rouges à 0,5 p. 100. Pour chaque réaction on fait deux

témoins hématies (0,5 ml d'eau salée + 0,5 ml de suspension globulaire). Ceci nous permet de juger du bon état des hématies utilisées.

La lecture s'effectue après un séjour de 3 heures à +4°C. La réaction est notée de zéro à 4 selon l'intensité des agglutinats.

On définit le titre hémagglutinant comme l'inverse de la plus haute dilution donnant une hémagglutination à 2.

3. Technique d'inhibition de l'hémagglutination

Nous avons utilisé la technique décrite par SOHIER (1964). Les sérums utilisés sont les sérums de référence fournis par la N.F.⁽¹⁾ (sérums de singe). Ces sérums sont au préalable titrés contre avec des souches de référence. Ils sont utilisés, à une dilution choisie de façon à contenir 10 unités hémagglutinantes, après avoir été au préalable traités par le kaolin de façon à éliminer les inhibiteurs non spécifiques.

Technique -

- les globules rouges sont préparés suivant la méthode précédemment décrite
- le diluant : nous avons utilisé l'eau salée à 8,5g p. 1000 de NaCl
- le traitement des sérums : on prépare la suspension de kaolin de la façon suivante :

kaolin lavé acide (Merck)	25 g
eau salée à 8,5g p. 1000	100 ml.

On agite vigoureusement de façon à obtenir une solution laiteuse homogène.

On mélange ensuite :

sérum non dilué (1 volume)	0,2 ml
diluant (4 volumes)	0,8 ml
suspension de kaolin (5 volumes)	1 ml.

On agite vigoureusement le mélange. On laisse adsorber les inhibiteurs pendant 20 minutes à la température du laboratoire en agitant de temps à autre. On centrifuge à 2000 tours pendant 20 minutes. Le surnageant représente le sérum traité considéré dilué au 1/10. C'est lui qui est engagé dans le test après dilution convenable.

(1) National foundation for Infantile Paralysis.

La réaction -

Nous avons adopté une microméthode afin de n'utiliser que de faibles quantités de sérums immuns de référence.

TITRAGE DE L'ELUAT - On procède d'abord au titrage du virus. Le principe de la méthode est le même que celui indiqué précédemment. Nous avons simplement modifié les quantités de réactifs engagés :

virus dilué	2 gouttes normales
eau salée à 8,5g p. 1000	1 " "
suspension de globules rouges à 1 p. 100	1 " "

La réaction est effectuée dans de petits tubes à fond rond (70 mm de long) (7 mm de diamètre). La lecture est faite après un séjour de 1 heure et demie à 2 heures à +4°. Une hémagglutination nette pour la plus grande dilution d'antigène est considérée comme contenant l'unité hémagglutinante. On diluera alors l'éluat de façon à ce que l'antigène utilisé dans la réaction d'inhibition contienne 4 à 8 unités hémagglutinantes.

REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION - On procède ensuite à l'épreuve d'inhibition. On met d'abord dans les tubes le sérum (une goutte normale) à concentrations décroissantes. On ajoute deux gouttes normales d'antigène dilué à 4 - 8 unités hémagglutinantes dans tous les tubes. On laisse en contact une heure à la température du laboratoire. On ajoute alors la suspension d'hématies à 1 p. 100 (1 goutte normale) par tube. Le contact est effectué à +4°C pendant une heure et demie à deux heures. Pour chaque test on aura soin d'inclure les témoins prouvant la validité de la réaction :

Témoin globules rouges :

eau salée à 8,5g p. 1000	3 gouttes
globules rouges	1 goutte

Témoin sérum :

sérum traité à la 1ère dilution engagé dans le test d'inhibition	1 goutte
eau salée à 8,5 g p. 1000	2 gouttes
suspension de globules rouges	1 goutte

Ce témoin permettra de révéler éventuellement la présence d'agglutinines naturelles anti-hématies humaines dans les sérums.

Témoin d'antigène :

	dilution du test	1/2	1/4	1/8
dilution d'antigène	(4/8 U)			
	2 gouttes	2 gouttes	2	2
eau salée à 8,5 g p.1000	1 "	1 "	1	1
suspension de globules rouges	1 "	1 "	1	1

Ce témoin permet de s'assurer que la dilution de virus engagée dans le test d'inhibition est correcte.

CHAPITRE II

ETUDE DE L'HETEROGENEITE DES PARTICULES INFECTIEUSES
des ECHOvirus type 6 et des Coxsackievirus B4

Dans cette partie de notre travail nous rapportons les résultats obtenus par chromatographie des entérovirus suivants :

. 1 virus ECHO 11 (souche 15.36) reçu d'un laboratoire étranger, sous l'étiquette "ECHOvirus type 6 souche prototype" ; alors que notre travail avait déjà progressé, un contrôle nous amena à constater qu'il s'agissait en fait d'un ECHOvirus type 11, nous avons néanmoins décidé de garder ce virus comme témoin.

. 10 virus ECHO de type 6 dont les souches prototypes d'AMORI et DIMEO et 8 souches isolées au Laboratoire de 1961 à 1965 au cours de syndromes cliniques divers ou chez des sujets cliniquement sains au cours d'enquêtes systématiques. L'origine de ces souches est indiquée dans le tableau I.

. 9 virus Coxsackie B de type 4 isolés au Laboratoire au cours de la même période ou reçus de laboratoires européens. Leur origine est indiquée dans le tableau II.

I - Reproductibilité de la méthode

Pour l'apprécier nous avons toujours chromatographié plusieurs virus en même temps, généralement six, sur des colonnes montées côte à côte. Un virus témoin, la souche ECHO 11 (15.36), a été chaque fois inclus dans la série des virus chromatographiés. Ceci nous a permis d'évaluer la reproductibilité des résultats et de déceler le cas échéant un défaut technique dans n'importe quelle série.

La souche témoin a été ainsi chromatographiée 6 fois, les six antigènes provenant tous du même stock de virus.

TABLEAU I - Souches ECHOvirus 6.

Numéro	Année	Origine	Diagnostic clinique
3349	1963	AVIGNON	Méningite lymphocytaire.
3653	1964	LYON	Convulsions.
4318	1964	COLMAR	Contact de sujet atteint d'une méningite lymphocytaire.
4165	1964	LYON	Méningite lymphocytaire.
2201	1964	LYON	Enquête épidémiologique.
2235	1961	LYON	Enquête épidémiologique.
2206	1961	LYON	Enquête épidémiologique.
2251	1961	LYON	Enquête épidémiologique.

TABLEAU II - Souches Coxsackie B4.

Numéro	Année	Origine	Diagnostic clinique
2021	1961	CLERMONT-FERRAND	Méningite lymphocytaire.
2273	1961	ANGERS	Syndrome abdominal-gastro-entérite.
3264	1963	TROYES	Enfant hospitalisé pour syndrome non précisé.
3216	1963	CLERMONT-FERRAND	Diarrhée et syndrome méningé.
3185	1963	LYON	Angine.
6.04	Reçue 1955	SUEDE	Non indiqué.
6.07	Reçue 1957	ITALIE	Non indiqué.
6.06	1955	HOLLANDE	Myocardite du nouveau-né.
6.14	1955	HOLLANDE	Non indiqué.

Name		Address	
John Doe		123 Main St	
Jane Smith		456 Elm St	
Bob Johnson		789 Oak St	
Alice Brown		101 Pine St	
Charlie Davis		202 Cedar St	
Diana Evans		303 Birch St	
Frank Green		404 Spruce St	
Grace Hill		505 Willow St	
Henry King		606 Ash St	
Ivy Lee		707 Hickory St	
Jack Miller		808 Sycamore St	
Karen Nelson		909 Magnolia St	
Leo Ortiz		1010 Dogwood St	
Mia Parker		1111 Redwood St	
Noah Quinn		1212 Cypress St	
Olivia Reed		1313 Juniper St	
Peter Scott		1414 Fir St	
Quinn Taylor		1515 Palm St	
Rory Vance		1616 Cedar St	
Sara Webb		1717 Birch St	
Tina White		1818 Spruce St	
Uma Young		1919 Willow St	
Victor Zane		2020 Ash St	

Name		Address	
John Doe		123 Main St	
Jane Smith		456 Elm St	
Bob Johnson		789 Oak St	
Alice Brown		101 Pine St	
Charlie Davis		202 Cedar St	
Diana Evans		303 Birch St	
Frank Green		404 Spruce St	
Grace Hill		505 Willow St	
Henry King		606 Ash St	
Ivy Lee		707 Hickory St	
Jack Miller		808 Sycamore St	
Karen Nelson		909 Magnolia St	
Leo Ortiz		1010 Dogwood St	
Mia Parker		1111 Redwood St	
Noah Quinn		1212 Cypress St	
Olivia Reed		1313 Juniper St	
Peter Scott		1414 Fir St	
Quinn Taylor		1515 Palm St	
Rory Vance		1616 Cedar St	
Sara Webb		1717 Birch St	
Tina White		1818 Spruce St	
Uma Young		1919 Willow St	
Victor Zane		2020 Ash St	

Les éluats provenant de ces six expériences ont été titrés au cours de neuf expériences. Les chiffres obtenus figurent dans le tableau III. Le diagramme d'élution (figure 1) montre que ce virus présente un maximum d'élution à la concentration 0,2 M.

Nous avons essayé de préciser la différence assez grande existant entre les chiffres des fractions 0,1 M et 0,2 M pour savoir si elle est significative des caractères des particules virales éluées à ces concentrations de phosphate.

Les chiffres variant, selon les fractions, de 15 à 18 nous avons calculé les limites de confiance des données absolues, compte tenu du t de STUDENT ; celui-ci, si l'indice de probabilité retenu est de 0,01, varie ici de 2,9 à 2,95, nous obtenons ainsi les chiffres suivants :

- virus stock (avant chromatographie) :

$$4,1 \times 10^6 \pm 19 \times 10^6 \text{ PFU / 0,1 ml}$$

- fraction d'élution 0,1 M :

$$24 \times 10^1 \pm 27 \times 10^1 \text{ PFU / 0,1 ml}$$

- fraction d'élution 0,2 M :

$$109 \times 10^5 \pm 52 \times 10^5 \text{ PFU / 0,1 ml}$$

Ces chiffres montrent que les fractions 0,1 et 0,2 M se trouvent dans des limites bien distinctes et que les données numériques les concernant ne sont pas réparties au hasard.

II - Diagrammes d'élution des différents virus (pouvoir infectieux)

Ces diagrammes sont représentés sur les figures 2 et 3 ; les données numériques ont été rassemblées dans les tableaux IV et V. On peut faire différentes remarques quant à ces résultats :

. La quantité de virus fixée sur la colonne est importante, puisqu'elle est supérieure à 90 p. 100 pour la plupart des souches sauf deux (83,5 et 88 p. 100) ; il ne semble pas y avoir de différences entre les deux groupes de virus.

TABLEAU III. — Titrage des éluats de la souche témoin ECHO 11 n° 1536.

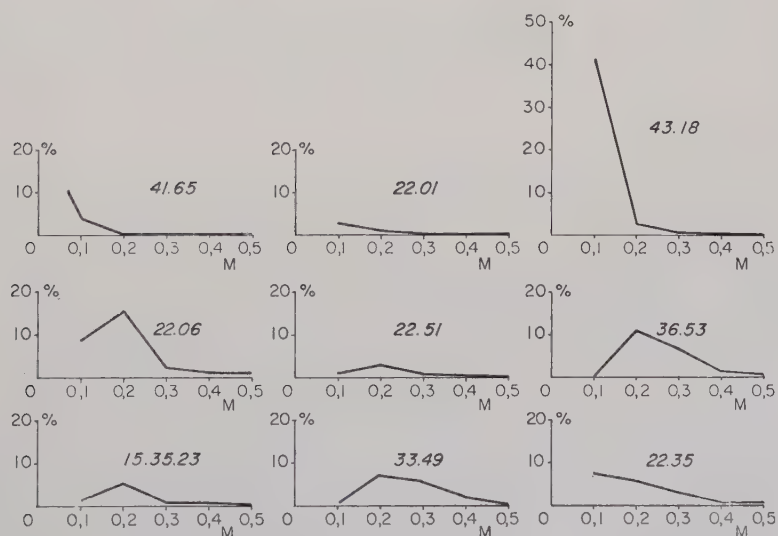
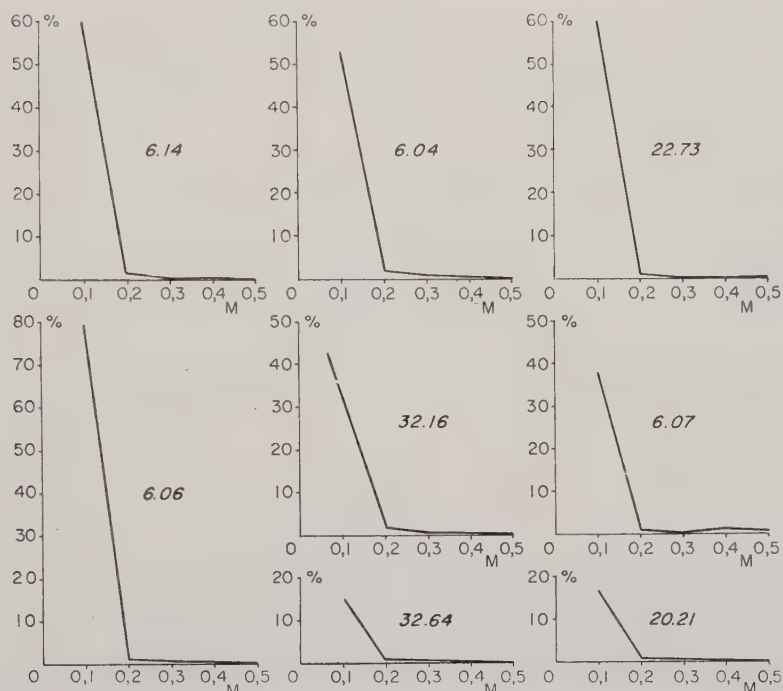
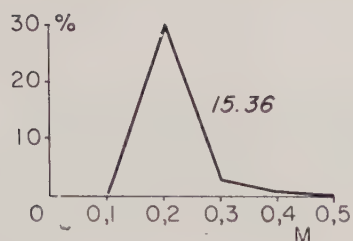
N° expér.	% fixation du virus	% élution 0,1 M	% élution 0,2 M	% élution 0,3 M	% élution 0,4 M	% élution 0,5 M
1	99	0,002		2,3	0,2	
2	99	0,007	37	6,2	0,37	
3	99		5	4,5	0,51	
4	99	0,001	23	1,8	0,037	0,02
5	99	0,010	20	1,6	2,5	0,65
6	99	0,002	10	1,7	0,09	0,02
7	99	0,09	0,8	0,7	0,13	0,04
8	99	0,010	68	5,8	0,63	0,53
9	99		64	0,6	0,28	0,12
Moyenne:	99	0,017	28,4	2,8	0,52	0,23

TABLEAU IV. — Elution des virus Coxsackie B4.

VIRUS	% fixation du virus	% élution 0,1 M	% élution 0,2 M	% élution 0,3 M	% élution 0,4 M	% élution 0,5 M	% élution totale
6-07	98,6	38,7	0,43	0,10	0,90	0,57	40,7
6-14	99	60,7	1,28	0,10	0,09	0,07	62,2
6-04	99,6	52,5	1,16	0,47	0,31	0,11	54,5
6-06	99	79,4	0,5	0,014	0,17	0,17	80,2
03264	88	15	0,19	0,08	0,04	0,03	15,3
03216	97	42,9	1,17	0,20	0,10	0,03	44,1
02021	95	16	0,29	0,09	0,03	0,007	16,4
03185	96	60	1,3	0,32	0,30	0,13	62
02273	92	60,8	0,32	0,13	0,05	0,10	61,4
Moyenne:	96,02	47,3	7,3	0,16	0,22	0,13	48,4

TABLEAU V. — Elution des virus ECHO 6.

N° DE LA SOUCHE	% fixation du virus	% élution 0,1 M	% élution 0,2 M	% élution 0,3 M	% élution 0,4 M	% élution 0,5 M	% élution totale
02235	100	7,6	6,02	3,22	0,45	0,45	17,74
03349	99,9	0,33	7,3	6,0	1,7	0,001	15,33
15-35-23	99	1,5	5,6	0,55	0,61	0,12	8,38
04318	85,3	41,6	2,8	0,19	0,13	0,075	44,8
02206	99,6	8,6	15,7	2,3	1,1	1,1	28,8
02251	99,7	1,2	2,5	0,4	0,08	0,09	4,27
03653	99	0,008	10,9	7,5	1,4	0,004	19,80
04165	99	10,8	3,8	0,05	0,02	0,22	14,9
02201	100	2,7	0,74	0,24	0,14	0,08	3,9
Moyenne:	97,9	8,25	6,1	2,2	0,62	0,23	17,54



. la dernière colonne des deux tableaux IV et V montre que les moyennes des pourcentages de virus élué par rapport au nombre de particules fixées sont variables selon le groupe considéré : 18 p. 100 pour les ECHO 6 et 43 p. 100 pour les Coxsackie B4.

. si tous les diagrammes d'élution du groupe des Coxsackie B4 présentent un aspect analogue de courbe à pente régulièrement décroissante, il n'en est pas de même du groupe des ECHO 6. Ces derniers se répartissent en deux groupes selon que le maximum d'élution se place à la molarité 0,1 ou 0,2. Dans le premier groupe (0,1 M), se trouvent les virus 22.01, 22.35, 41.65 et 43.18 ; dans le second groupe figurent, outre le prototype 6 prime DIMEO (souche 15.35) les souches 22.06, 22.51, 33.49 et 36.53. Il est à remarquer que nous ne trouvons pas ici de courbes bimodales telles que SIMON (1963) en a obtenues dans des conditions expérimentales voisines.

III - Titration du pouvoir hémagglutinant

Ce titrage a été effectué suivant le protocole décrit précédemment.

Pour les souches de virus ECHO hémagglutinantes nous avons recherché le titre hémagglutinant aussi bien pour le virus non traité que pour les différents éluats obtenus après chromatographie.

Nous avons ainsi étudié la souche ECHO 11 (15.36), celle qui nous a servi de "témoin" dans nos chromatographies ainsi que la souche de virus ECHO 6 n° 43.18.

1 - Résultats obtenus avec la souche ECHO 11 (15.36)

Comme il a été dit précédemment cette souche a été chromatographiée six fois. Le titre hémagglutinant des différents éluats a toujours été déterminé peu de temps après la chromatographie.

Les titres obtenus figurent dans le tableau IV. Le diagramme d'élution (figure 4) montre que ce virus présente un maximum à la concentration 0,2 M. La courbe du titre hémagglutinant a une forme comparable à celle du pouvoir infectieux. Nous pouvons néanmoins faire les constatations suivantes :

- la fixation de l'hémagglutinine est presque totale. Nous avons déjà vu en titrant le pouvoir infectieux des éluats que la quantité de virus fixé est importante puisqu'elle est supérieure à 90 p. 100 pour la plupart des souches. Nous pouvons donc dire que le virus se fixe presque totalement sur la colonne.

- la fraction 0,1 M a un pouvoir hémagglutinant important alors que son pouvoir infectieux est quasi nul comme nous l'avons vu précédemment.

Nous avons calculé pour cette fraction le rapport entre la moyenne des titres hémagglutinants et la moyenne des titres infectieux ; dans nos six expériences nous avons trouvé les chiffres suivants :

	titre hémagglutinant / titre infectieux
virus non traité	0,77
fraction 0,1 M	877
fraction 0,2 M	0,6

Ces chiffres nous montrent que la fraction 0,1 M est pratiquement constituée de particules uniquement hémagglutinantes, alors que dans la fraction 0,2 M nous retrouvons, à quelque chose près, la même proportion que dans le virus avant chromatographie.

- dans la fraction 0,3 M le titre hémagglutinant baisse et il est pratiquement nul pour les fractions 0,4 et 0,5 M.

La fraction 0,1 M nous a semblé intéressante puisqu'elle a un pouvoir hémagglutinant élevé alors que son titre infectieux est pratiquement nul. Dans cette fraction nous avons réalisé une concentration de particules virales uniquement hémagglutinantes.

Nous avons essayé de voir comment se comportent ces particules virales hémagglutinantes et dépourvues de pouvoir infectieux quand elles sont mises en contact avec une nappe cellulaire en culture. Pour cela nous avons procédé de la manière suivante :

Une bouteille (1) contenant une nappe de cellules de rein de singe (*Macacus irus*) en culture primaire, est inoculée avec 0,1ml de la fraction 0,1 M. Après un séjour à l'étuve à 37°C de 1 heure on recueille l'inoculum, on rince la nappe cellulaire avec le milieu de Parker. Le liquide de rinçage et l'inoculum sont mélangés. On recherche ensuite le pouvoir hémagglutinant de ce mélange.

Parallèlement on titre le pouvoir hémagglutinant d'une partie aliquote de la même fraction non adsorbée sur culture cellulaire.

Nous avons essayé de voir d'autre part quelles sont les particules fixées par les hématies. Pour cela après avoir procédé à une hémagglutination en tube de la fraction 0,1 M, (la technique est celle décrite dans la partie "Matériel et Techniques". Les tubes remplacent simplement ici la plaque à godets en plastique).

Après la lecture de la réaction le tube correspondant à la plus forte dilution donnant une hémagglutination égale à 2 est centrifugée à 3000 tours pendant 10 minutes. Le surnageant est décanté ; on titre ensuite son pouvoir infectieux par la méthode des plages.

Ces expériences ont été faites avec les fractions 0,1 M provenant de la chromatographie à 5 reprises différentes de la souche ECHO 11 n°15.36.

A partir du résultat de ces expériences (tableau VII) nous pouvons faire les constatations suivantes :

1/ les globules rouges comme les cellules en culture fixent les particules infectieuses,

2/ les cellules en culture fixent les particules infectieuses mais sont indifférentes aux particules hémagglutinantes. En effet, le titre hémagglutinant est pratiquement le même avant et après adsorption sur les cellules en culture.

(1) Nous avons utilisé les mêmes bouteilles que celles qui nous ont servi à titrer le pouvoir infectieux par la méthode des plages.

TABLEAU VI

TITRAGE DES ELUATS DE LA SOUCHE TEMOIN ECHO 11 N° 15.36

N° expérience	Fraction 0,1M	Fraction 0,2M	Fraction 0,3M	Fraction 0,4M	Fraction 0,5M
1	128	512	16	0	0
2	128	512	32	4	0
3	512	1024	64	4	4
4	256	512	64	4	4
5	512	256	128	4	4
6	512	32	128	4	0

TABLEAU VII

N° expérience	Titre INFECTIEUX en PFU / 0,1 ml			Titre HEMAGGLUTINANT	
	Titre initial	Titre après contact avec les globules rouges	Titre après adsorption sur cellules	Titre initial	Titre après adsorption sur cellules
1	790	> 100	250	100	100
2	450	200	50	200	200
3	79000	6000	570	100	100
4	5850	> 100	640	100	200
5	3980	200	975	100	200

LAHELLE (1958) avait déjà vu que le titre infectieux d'une souche de virus ECHO 6 hémagglutinante était nettement diminué après contact avec les globules rouges. Ceci concorde avec ce que nous avons trouvé.

2 - Résultats obtenus avec la souche ECHO 6 (43.18)

Le diagramme d'élution (titre infectieux) de cette souche est représenté sur la figure 3. Nous voyons que la maximum d'élution se fait à la concentration 0,1 M contrairement à la souche 15.36 où le maximum est à la concentration 0,2 M.

Dans l'étude de l'élution de l'hémagglutinine nous retrouvons les mêmes différences entre ces deux souches ; en effet le maximum d'élution de l'hémagglutinine pour la souche 43.18 se situe à la concentration 0,1 M (figure 5), les quatre autres fractions ayant un pouvoir hémagglutinant très faible. Si nous calculons pour cette souche le rapport entre le titre hémagglutinant et le titre infectieux des différentes fractions, nous trouvons les chiffres suivants :

	Titre infectieux / titre hémagglutinant
virus non traité	16
fraction 0,1 M	18,5
fraction 0,2 M	342

En comparant ces chiffres avec ceux de la souche 15.36, nous voyons qu'il y a une concentration de particules hémagglutinantes dans la fraction 0,2 M pour la souche 43.18, alors que cette concentration se fait à la fraction 0,1 M pour la souche 15.36.



Fig. 4

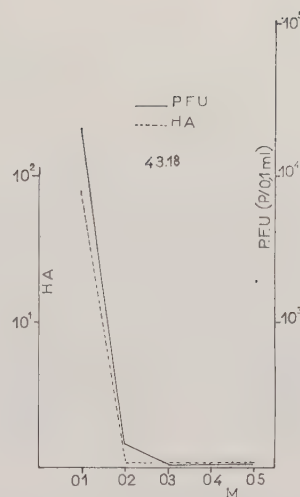


Fig. 5

Fig. 4. — Diagramme d'élution de la souche ECHO type 11 n° 15.36.
en ordonnée : titres infectieux et titres hémagglutinants des éluants.
en abscisse : les concentrations de l'éluant (en moles).

Fig. 5. — Diagramme d'élution de la souche ECHO type 6. (mêmes représentations que sur la figure 4.

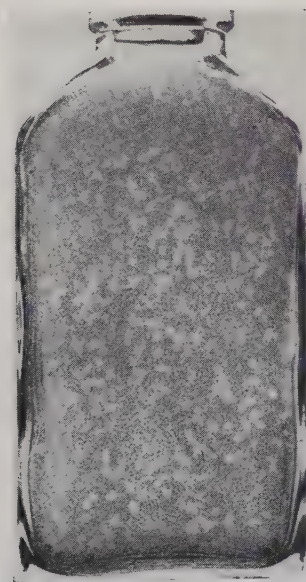


Fig. 6



Fig. 7

Fig. 6. — Virus ECHO type 11, souche 15.36. Petites plaques, à contours flous.
Cellules : rein de M. Iru. Lecture six jours après l'inoculation.

Fig. 7. — Virus ECHO type 6 d'Amori, très petites plaques : phase B.

IV - DISCUSSION

La répartition des ECHOvirus de type 6 en deux groupes confirme l'hétérogénéité de ce type, hétérogénéité déjà bien vue par d'autres auteurs (BARRON, 1962 ; KARZON, 1959 ; SUTO, 1962) alors que les virus Coxsackie B4 n'ont pas, à notre connaissance, révélé cette hétérogénéité des souches à l'intérieur d'un type (bien qu'une hétérogénéité de la population des particules virales ait été décrite (CHOPPIN, 1962).

Le nombre de souches chromatographiées est encore trop restreint pour permettre une conclusion définitive. Cependant, une première évaluation des limites de confiance des chiffres obtenus pour les fractions 0,1 M et 0,2 M dans ces deux groupes de virus ECHO 6 est en faveur d'une différence significative. On peut donc penser que ces formes différentes de la courbe d'élution traduisent réellement un comportement différent.

La corrélation entre ces diagrammes et d'autres caractères connus des échovirus est difficile à établir :

1° - la taille des plages provoquées par chaque groupe est variable (voir figures 6 à 11). Il n'y a pas de relation nettement visible entre l'aspect des plages et la forme du diagramme d'élution.

2° - l'origine de ces souches est, elle aussi, apparemment sans rapport avec le diagramme d'élution. Les souches 22.01, 22.06, 22.35, et 22.51, ont toutes été isolées dans une même collectivité au même moment (Novembre - Décembre 1961) chez des enfants sains au cours d'une enquête épidémiologique. Or parmi ces quatre souches, deux se comportent d'une manière et deux d'une autre. S'agirait-il de deux souches différentes ayant été introduites au même moment dans cette collectivité ? Ce fait est en accord, quoique sur une petite échelle, avec les différentes phases B, S, I trouvées par KARZON (1959) dans une épidémie de méningite à ECHOvirus 6 aux Etats-Unis.

Si l'on se rapporte à l'interprétation selon laquelle le passage de la phase "S" (specific) à la base "B" (broad) serait fonction de l'adaptation progressive des souches sur cultures cellulaires, la souche DIMEO 6 prime, représentée par une courbe en "cloche", serait du type B ; il pourrait donc en être de même des souches 22.06, 22.51, 33.49 et 36.53. Or ces dernières souches n'ont subi qu'un faible nombre de passages avant leur chromatographie, puisqu'aucun des virus étudiés n'avait été passé plus de trois fois en culture de rein de singe. Cependant, les plages formées par nos souches ne sont jamais aussi petites que celles que forment les souches prototypes d'AMORI et DIMEO (figures 7 et 8) étudiées ici dans leur vingt-quatrième et seizième passage respectivement. On peut donc penser qu'il se ferait une évolution des virus ECHO 6 dans le sens grande plage $\longrightarrow$ plage moyenne $\longrightarrow$ petite plage, qui correspondrait au schéma $S \longrightarrow I \longrightarrow B$ de KARZON, le virus à l'isolement pouvant déjà se présenter sous la forme I. La souche 41.65, obtenue chez un malade souffrant de méningite aseptique, est curieuse car les plages qu'elle forme sont d'aspect mixte avec, notamment une sorte de satellisation de petites plages autour de plages nettement plus grandes (figure 9). S'agit-il d'images de passages d'une phase nettement "grande plage" (S ?) à une phase "petite plage" (B ?) ? Par ailleurs, compte tenu des remarques de HAAS⁽¹⁾ concernant le déplacement de la courbe d'élution vers la droite de l'abscisse, c'est-à-dire vers les plus grandes molarités de phosphate dans le cas de souches atténuées (poliovirus, ECHOvirus 9 sur colonne d'alumine $Al(OH)_3$, on peut se demander si l'aspect en "clocher" de la courbe d'élution ne traduit pas la même caractéristique que dans le cadre des ECHOvirus 6.

(1)

Pourtant, HAAS ne voit pas varier le diagramme d'élution des ECHOvirus 9 au cours de passages successifs, en nombre restreint il est vrai; cela, rapporté aux ECHOvirus 6, signifierait que la forme du diagramme d'élution est une caractéristique génétique de ces virus ; mais des mutants peuvent apparaître soit spontanément dans la nature, soit par passages répétés in vitro, ce qui a déjà fait l'objet d'applications étendues dans le domaine des poliovirus. Une autre remarque s'impose : cette évolution des souches

d'ECHOvirus type 6, quels que soient sa marche et son aboutissement, se traduisant en chromatographie par passage d'un type de courbe d'élution à un autre type, semble se faire par la disparition de la population virale éluee par la concentration 0,1 M de phosphate. Y aurait-il une catégorie de particules susceptibles de disparaître rapidement par passages in vitro ?

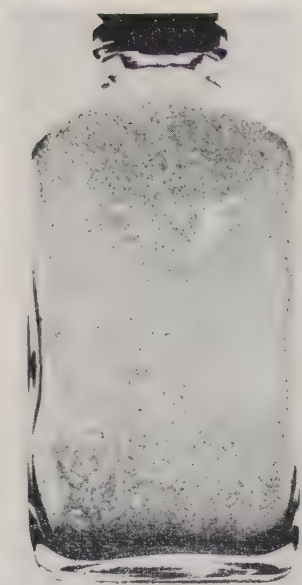


Fig. 8

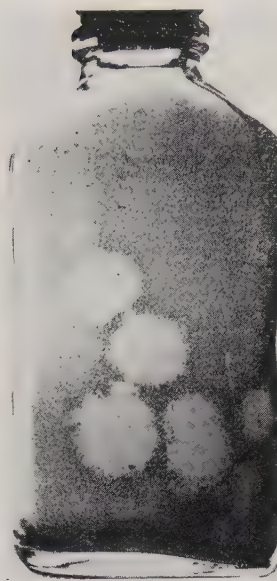


Fig. 9

Fig. 8. — Virus ECHO type 6' Di Meo, très petites plages : phase B.

Fig. 9. — Virus ECHO type 6 n° 33.49, grandes plages : phase S ?

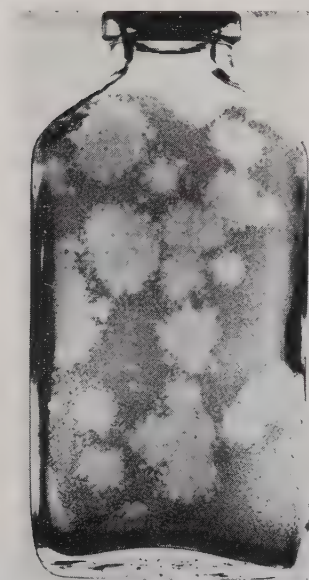


Fig. 10

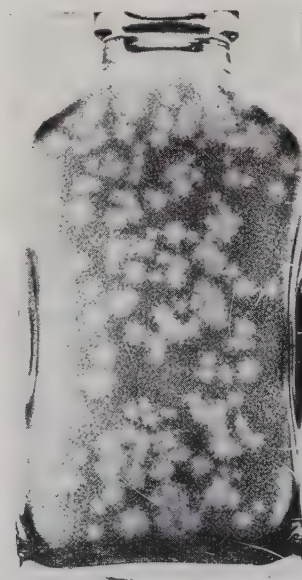


Fig. 11

Fig. 10. — Virus ECHO type 6 n° 41.65, aspect de transition ?

Fig. 11. — Virus ECHO type 6 n° 36.53, plages moyennes : phase I ?

CHAPITRE III

ETUDE DE L'HEMAGGLUTININE

Nous avons vu précédemment que le titre hémagglutinant des différentes fonctions était variable. L' hémagglutinine est apparue comme hétérogène au moins quand on la considère sous l'angle de l'élution par les solutions de phosphate disodique de molarité croissante. Nous avons vu cela en étudiant une souche d'ECHO 11 (15.36) et une souche d'ECHO 6 (43.18) hémagglutinantes.

Nous avons voulu étudier plus en détail l'élution de la particule hémagglutinante. Pour cela nous avons chromatographié les virus suivants :

I°) six souches de virus ECHO 3 isolées au laboratoire en 1964 et 1965 au cours de syndromes cliniques divers. L'origine de ces souches est indiquée dans le tableau VIII.

TABEAU VIII

SOUCHES ECHOVIRUS TYPE 3

Numéro	Année	Origine	Diagnostic clinique
9.60	1965	Lyon	non indiqué
57.22	1965	Forbach	dyspepsie - diarrhée
4.77	1964	Paris	diarrhée
55.29	1965	Lyon	non indiqué
40.38	1964	Clermont-Ferrand	diarrhée - coma
54.22	1965	Mulhouse	Syndrome bulbaire rapidement fatal.

2°) six souches de virus ECHO 7 dont la souche prototype Wallace et 6 souches isolées au laboratoire en 1963 et 1964. Leur origine est indiquée dans le tableau IX.

TABLEAU IX

SOUCHES ECHOVIRUS TYPE 7

Numéro	Année	Origine	Diagnostic clinique
4.11	1964	Nancy	Non indiqué
39.68	1964	Lyon	angine - polyadénopathie
36.10	1964	Annecy	syndrome méningé
36.74	1964	Lyon	érythème scarlatiforme
33.31	1963	Lyon	myocardite

3°) onze souches de virus ECHO 11 dont la souche prototype GREGORY, la souche 15.36 qui nous avait servi de témoin dans la première partie de ce travail et 9 souches isolées au laboratoire en 1964 et 1965. L'origine de ces souches est indiquée dans le tableau X.

TABLEAU X

SOUCHES ECHOVIRUS TYPE 11

Numéro	Année	Origine	Diagnostic clinique
44.30	1965	Beauvais	contact de sujet atteint de poliomyélite.
5.25	1965	Rodez	contact de sujet atteint de poliomyélite.
47.97			
11.57	1965	Clermont-Ferrand	syndrome méningé
53.25	1965	Cholet	monoplégie
ES.15	1965	Espagne	gastroentérite infantile
36.92	1964	Lyon	non indiqué
54.00	1965	Lyon	rhinopharyngite - diarrhée
49.84	1965	Villeneuve sur Lot	enfant convalescent de poliomyélite.

4°) La souche prototype ECHOvirus 12 (TRAVIS)

5°) La souche prototype ECHOvirus 29 (J V 10)

RESULTATS

I - Reproductibilité de la méthode

Comme nous avons employé dans cette partie de notre travail un collecteur de fractions, nous ne pouvions pas faire des chromatographies en série en introduisant dans chaque série un virus "témoin" comme nous l'avions fait au début. Mais pour apprécier cette reproductibilité nous avons chromatographié dans les mêmes conditions un certain nombre de ces virus à deux reprises et nous n'avons jamais observé de variations notables.

D'autre part, au cours de la première partie de notre travail, nous n'avons jamais observé de variations; aussi pourrions-nous dire que notre méthode semble être reproductible. Toutes les fois que nous avons recommencé une expérience nous avons retrouvé les mêmes résultats.

II - Etude des éluats obtenus

Dans cette partie de notre travail, nous avons uniquement étudié le pouvoir hémagglutinant des fractions obtenues. Nous avons testé le pouvoir hémagglutinant selon la méthode décrite précédemment.

Nous avons tracé les diagrammes d'élution pour chacun des virus. Ces diagrammes sont représentés sur les figures 12, 13 et 14. Nous pouvons faire les constatations suivantes :

- ces diagrammes montrent que ces virus ont plusieurs maxima d'élution. Il semble que les virus possèdent une hémagglutinine hétérogène dont les différents constituants éluent à des concentrations de Na_2HPO_4 bien

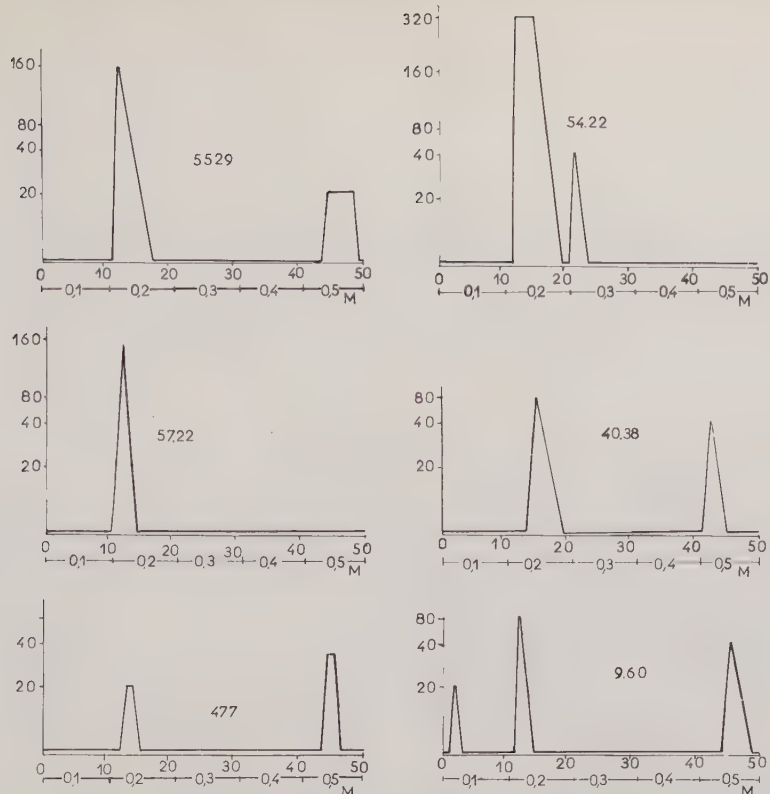


Fig. 12. — Diagrammes d'élution de l'hémagglutinine des virus ECHO 3.
En abscisse : les concentrations molaires de l'éluant et le nombre de fractions recueillies
en ordonnée : le Titre hémagglutinant.

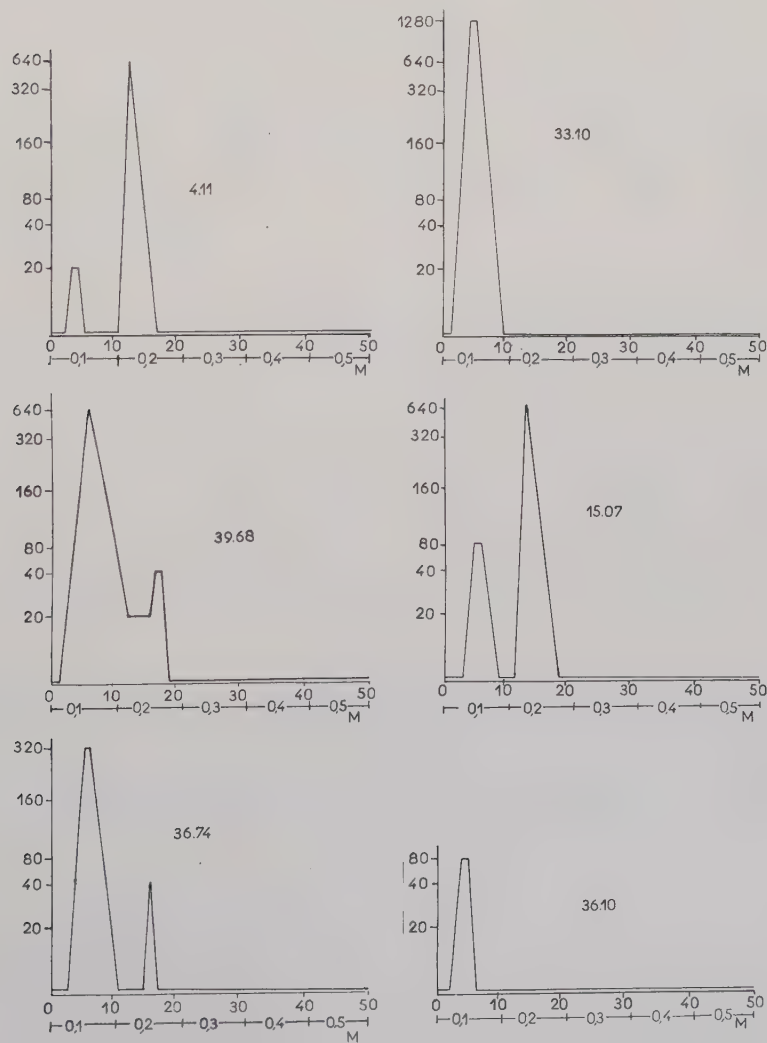


Fig. 13. — Diagrammes d'élution de l'hémagglutinine des virus ECHO 7.

déterminées. Cette élution à des concentrations différentes semble liée à des hémagglutinines qui sont de nature différente. Si nous examinons en détail les différents diagrammes d'élution, nous pouvons faire les constatations suivantes :

- Dans un type donné tous les antigènes n'ont pas le même diagramme d'élution. Ainsi, pour les 7 virus ECHO 7, cinq d'entre eux présentent deux pics d'élution l'un à 0,1 M et l'autre à 0,2 M. L'autre n'a qu'un pic à 0,1 M. Mais pour les quatre premiers le diagramme n'est pas identique ; en effet, deux d'entre eux ont leur maximum d'élution à 0,1 M et les deux autres ont leur maximum à 0,2 M.

Par contre, pour les virus ECHO 11, 4 souches présentent un diagramme d'élution à deux pics l'un à 0,1 M, l'autre à 0,2 M, alors que 7 souches présentent un diagramme d'élution à 3 pics : 0,1 M, 0,2 M et 0,3 M. D'autre part, alors que dans le premier groupe (à deux pics) les deux pics sont sensiblement de la même valeur, dans le second groupe le taux d'hémagglutinines éluant à 0,2 M est nettement plus élevé ; celui à 0,3 M est en général assez faible.

Si nous considérons maintenant les diagrammes d'élution de virus ECHO de type 3, nous trouvons une très grande diversité : sur les 7 souches chromatographiées, 4 présentent un pic d'hémagglutinines à la concentration 0,5 M ; ceci est un phénomène nouveau puisque, au cours de toutes nos expériences, nous ne l'avions pas observé avec les autres souches. Une de nos souches a 3 pics : l'un à 0,1 M, l'autre à 0,2 M et le 3ème à 0,5 M. Notons aussi que les 7 souches de virus ECHO 3 ont un pic à 0,2 M.

Nous voyons aussi que l'hémagglutinine élue à différentes molarités. On peut supposer que la population des particules hémagglutinantes d'un virus est hétérogène, ce qui explique les différents pics que nous avons trouvés.

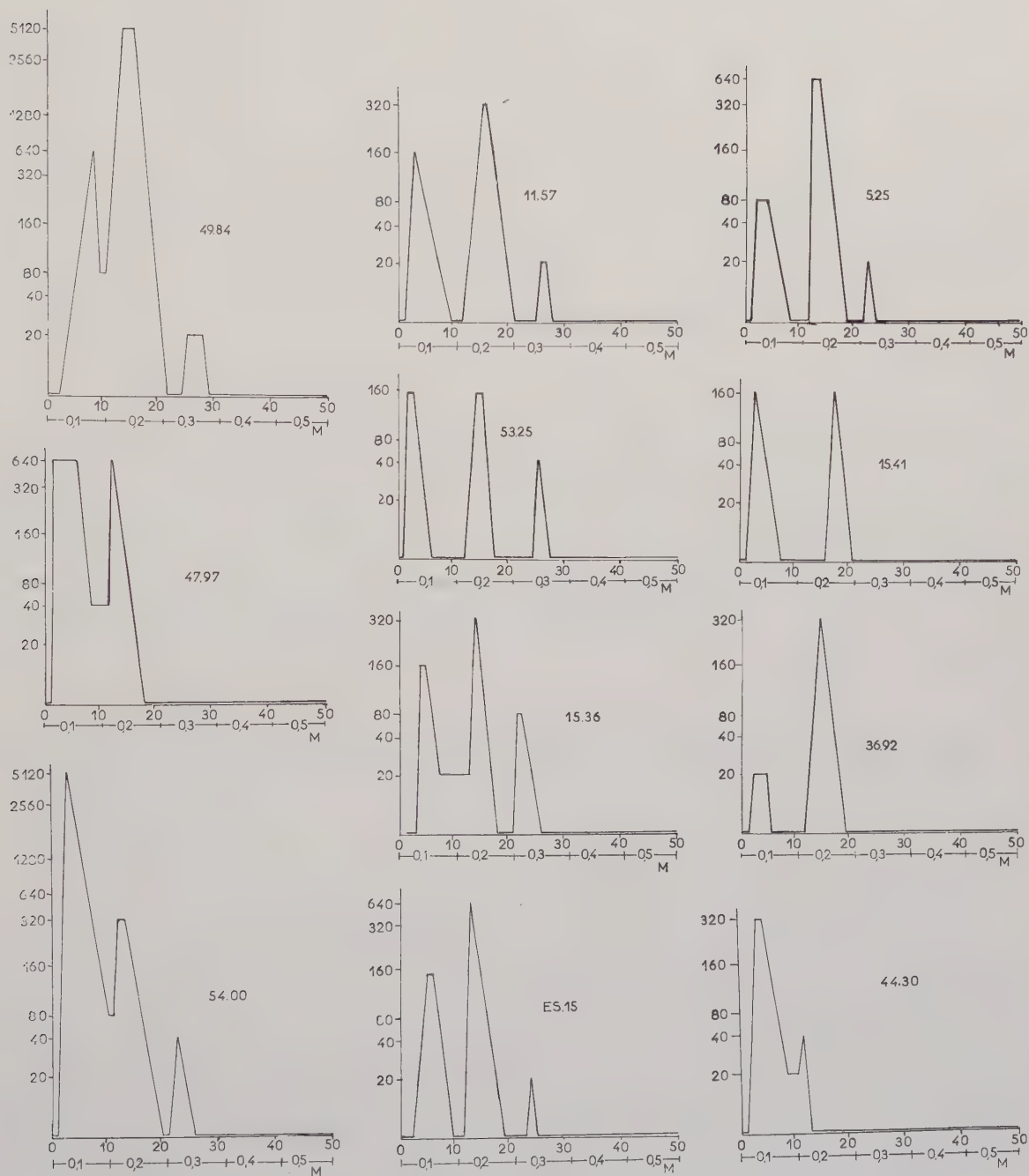


Fig. 14. — Diagrammes d'élution de l'hémagglutinine des virus ECHO 11 (mêmes représentations que sur la figure 12).

On remarquera, cependant, que pour un type donné, un pic s'avère être constamment retrouvé, seul, ou accompagné de pics accessoires. On pourrait ainsi définir une sorte de pic principal. Ceci ressort des figures 15, 16 et 17 où il apparaît que le pic principal des ECHOvirus 3 est situé à 0,2 M, et que pour les ECHOvirus 7 il se trouve à 0,1 M. Les ECHOvirus type 11 présentent la particularité de cumuler les deux pics principaux à 0,1 M et à 0,2 M. La constance de ces pics principaux ne peut évidemment être affirmée que pour les souches étudiées, et il peut toujours être possible d'observer des variations. Il y a là, cependant, un fait à retenir.

Nous avons toujours pratiqué une épreuve d'inhibition de l'hémagglutination sur les fractions ayant le maximum d'hémagglutinine. Ces inhibitions ont été effectuées avec des antisérums de référence. Nous avons toujours observé une inhibition de l'hémagglutination par le sérum correspondant, ce qui nous permet d'éliminer l'hypothèse de la présence possible d'un virus étranger dans les antigènes chromatographiés.

III - Etude de la possibilité de modification du diagramme d'élution des Hémagglutinines.

1°) - Modification par passages rejetés sur cultures cellulaires.

Etant donné la diversité des diagrammes obtenus avec les différentes souches nous avons pensé qu'il pourrait y avoir une évolution des souches par passages répétés in vitro - au départ les hémagglutinines élueraient à 0,1 M puis par passages répétés cette population virale disparaîtrait et on assisterait à l'apparition d'une autre population éluant à une plus forte concentration. C'est ce qui pourrait ressortir de la figure 18 où l'on voit qu'après 8 passages la souche prototype d'ECHOvirus 29 possède un pic à 0,1 M, le prototype d'ECHOvirus 11 possède deux pics à 0,1 M et 0,2 M après 9 passages. Pour le prototype d'ECHOvirus 7 nous avons un seul pic à 0,2 M après 13 passages, alors que le prototype d'ECHOvirus 3 possède deux pics à 0,1 M et 0,2 M après 24 passages. Quant au prototype d'ECHOvirus 12 il possède deux pics l'un à 0,1 M et l'autre à 0,2 M. Pour

éluant virus	0,1M	0,2M	0,3M	0,4M	0,5M
15.44		▲	▲		
40.38	▲	▲			▲
9.60		▲			▲
55.29		▲			▲
4.77		▲			▲
54.22		▲	▲		
57.22		▲			

Fig. 15. — ECHOvirus type 3

éluant virus	0,1M	0,2M	0,3	0,4M	0,5M
15.07	▲	▲			
4.11	▲	▲			
36.10	▲				
33.31	▲	▲			
36.74	▲	▲			
39.68	▲	▲			

Fig. 16. — ECHOvirus type 7

éluant virus	0,1M	0,2M	0,3M	0,4M	0,5M
15.41	▲	▲			
15.36	▲	▲	▲		
53.25	▲	▲	▲		
11.57	▲	▲	▲		
5.25	▲	▲	▲		
ES15	▲	▲	▲		
49.84	▲	▲	▲		
54.00	▲	▲	▲		
44.30	▲	▲			
36.92	▲	▲			
47.97	▲	▲			

Fig. 17. — ECHOvirus type 11

souches prototypes	nombre de passages	01M	02M	03M	04M	05M
ECHO 3 (Morrisey)	24		▲	▲		
ECHO 7 (Wallace)	13		▲			
ECHO 11 (Gregory)	9	▲	▲			
ECHO 12 (Travis)	10	▲	▲			
ECHO 29 (JV10)	8	▲				

Fig. 18. — Souches prototypes d'ECHOvirus

Fig. 15-16-17-18. — Représentation schématique des pics d'élution de l'hémagglutinine de divers type d'Entérovirus. Chaque triangle représente un pic d'élution.

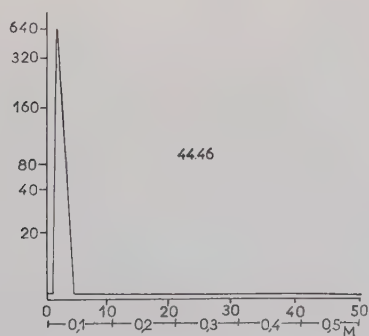


Fig. 19. — Diagramme d'élution de l'hémagglutinine du virus ECHO 6 n° 44-46 (même représentation que sur la figure 12)

vérifier une telle hypothèse nous avons choisi une souche de virus ECHO de type 6 isolée au Laboratoire; il s'agit de la souche 44.46, cette souche s'est montrée hémagglutinante dès son isolement. Nous avons chromatographié le 2ème passage et nous avons obtenu un diagramme avec un seul pic d'hémagglutinines éluant à la concentration 0,1 M, nous avons procédé à des passages successifs sur culture cellulaire de Rein de singe (*Cynomolgus Iru*s), nous avons chromatographié les 8ème, 16ème et 25ème passage. Nous avons obtenu toutes les fois un diagramme identique au premier (obtenu avec un antigène passé deux fois sur cellules). figure 19. Les souches qui ont été chromatographiées ont été pour la plupart isolées au laboratoire et n'avaient subi de ce fait qu'un très petit nombre de passages (trois à quatre en général) avant d'être chromatographiées.

Comme nous avons obtenu avec ces souches des diagrammes très variables de l'un à l'autre et pour la plupart à deux ou trois pics, on peut penser que cela n'est pas dû au nombre de passages des virus in vitro.

2°) - Modification par les conditions de culture du virus

Dans un travail sur le virus de la rougeole WANG-TAI-KIANG (1965) a montré qu'on pouvait séparer par centrifugation deux populations de particules virales hémagglutinantes. En étudiant la cinétique de l'apparition de ces deux populations de particules hémagglutinantes dans une culture, l'auteur a noté que les hémagglutinines "lourdes" apparaissent au début de la multiplication du virus. Les hémagglutinines légères n'apparaissent qu'après 7 jours de culture.

Nous avons essayé de voir si on pouvait retrouver ce dernier phénomène pour les virus ECHO. Nous avons inoculé la souche prototype GREGORY (15.41) à différentes concentrations, pour chaque concentration un lot a été laissé à 37°C jusqu'à dégénérescence complète des cellules, pour les autres nous avons arrêté la multiplication du virus par congélation à -20°C après 24, 48 et 72 heures de culture.

numéro du lot	dose de virus innoculée	temps d'incubation	% de cellules dégénérées	titre hémagglutinant			
				10	40	160	640
1	63.000	12 h	0				
2		24 h	25				
3		36 h	50				
4		48 h	75				
5		72 h	100				
6	6300	24 h	0				
7		48 h	50				
8		72 h	75				
9		96 h	100				
10	630	24 h	0				
11		48 h	25				
12		72 h	50				
13		96 h	75				
14		6 jours	100				
15	63	24 h	0				
16		48 h	25				
17		72 h	50				
18		96 h	75				

Fig. 20. — Titres hémagglutinants des différents lots de la souche prototype ECHOvirus 11 (Grégory) en fonction des doses inoculées et des temps d'incubation.

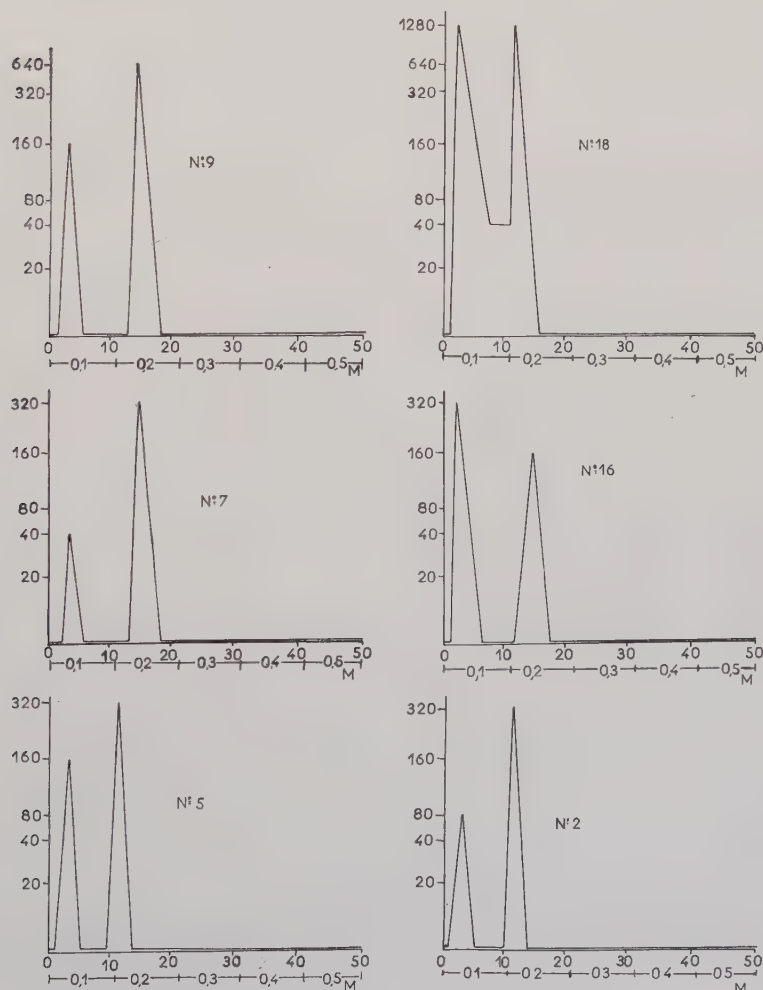


Fig. 21. — Diagrammes d'éluion de l'hémagglutinine des différents lots de la souche prototype d'ECHOvirus 11 (Grégory) (voir fig. 20).
(même représentation graphique que sur la figure 12).

Nous avons ainsi 18 lots différents, nous avons d'abord titré leur pouvoir hémagglutinant (figure 20), nous avons ensuite chromatographié les lots 2-5-7-9-16 et 18. Les diagrammes d'élution de l'hémagglutinine (figure 21) montrent que les différents lots ont tous deux pics, l'un à la concentration 0,1 M, l'autre à la concentration 0,2 M. Nous pouvons donc en conclure qu'au moins pour la souche étudiée nous ne retrouvons pas ce qu'a retrouvé WANG-TAI-KIANG avec le virus de la rougeole. Les deux pics d'hémagglutinines ne correspondent pas à un degré de maturation différent comme pour la rougeole.

IV - DISCUSSION

Les différentes fractions d'héماغglutinines correspondent à des particules différentes quant à leurs propriétés de surface; d'autres études ont montré des phénomènes analogues. Ainsi, pour le virus de la rougeole NORRBY (1963) a montré que l'héماغglutinine obtenue sur cellules de rein d'embryon humain pouvait être séparée, par centrifugation, en saccharose en deux fractions. Une fraction de grande taille supporte l'activité hémolytique et le pouvoir infectieux. Si on la traite par l'éther ou le TWEEN 80, ou la chaleur, on obtient une héماغglutinine de petite taille et on perd l'activité hémolytique. KITAWAKI (1964) en chromatographiant sur colonne de Diéthylamino éthyl cellulose le virus morbillieux concentré au préalable par le sulfate d'ammonium, obtient deux fractions héماغglutinantes l'une éluant à 0,15 M, l'autre à 0,2 M. (l'éluant utilisé est une solution de chlorure de sodium) dans ces mêmes conditions le pouvoir infectieux élue à 0,15 M, 0,2 M et 0,5 M.

Le même auteur a montré qu'après traitement par l'éther et le TWEEN 80 du virus morbillieux concentré au préalable par le sulfate d'ammonium, on obtient après chromatographie sur Diéthylamino cellulose en gradient discontinu deux pics d'héماغglutinines, l'un à 0,1 M, l'autre à 0,15 M, mais si la chromatographie est faite en gradient continu on obtient alors un seul pic à 0,1 M. L'auteur remarque que dans ce cas il y a une concentration des particules héماغglutinantes alors que le pouvoir infectieux est fortement diminué.

GORDON SMITH (1961) étudia par chromatographie sur phosphate de calcium plusieurs souches d'arbovirus. Il a vu ainsi que l'héماغglutinine de la souche WEST NILE élue dans un seul pic à 0,2 M et 0,3 M alors que le virus de la fièvre jaune comporte deux pics de particules héماغglutinantes l'un à 0,4 M, l'autre à 0,5 M.

Il a mis en évidence l'existence de deux héماغglutinines dans les groupes A et B des Arbovirus, l'une est la particule virale, l'autre est plus

petite, moins dense, précipitable par le sulfate de protamine. Ces deux hémagglutinines sont semblables au point de vue antigénique; l'auteur pense que la seconde est un composant de la surface du virus.

NICOLI (1965) a trouvé des résultats comparables à ceux de GORDON SMITH en chromatographiant des Arbovirus sur celluloses échangeuses d'ions ; il confirme le fait qu'aucune hémagglutinine soluble n'a pu être mise en évidence.

Le même auteur montra que la gel-filtration sur colonne d'agarose des Arbovirus révèle l'homogénéité du comportement des propriétés infectieuses et hémagglutinantes des préparations originales; le traitement par l'éther et les détergents rompt les particules virales ; cette rupture détruit le pouvoir infectieux et produit des unités hémagglutinantes.

Ainsi, l'étude du virus de la rougeole d'une part et des Arbovirus d'autre part, montre par des moyens différents (chromatographie et ultracentrifugation) l'hétérogénéité des particules hémagglutinantes d'une même souche. Ces données semblent être analogues à ce que nous avons trouvé pour les ECHO-virus que nous avons étudiés ; mais si les résultats sont analogues, ils ne semblent pas correspondre aux mêmes faits.

En effet, la nature physico-chimique et la structure de ces virus, myxovirus (rougeole), Adénovirus et Entérovirus, autorisent à penser que les données acquises pour les deux premiers ne sont pas applicables aux Entérovirus. Différence physico-chimique d'une part, puisque Myxovirus et Arbovirus sont sensibles aux solvants des lipides et aux détergents, et que ces substances peuvent jouer un rôle sur le fonctionnement de l'hémagglutinine ; différence structurale d'autre part, puisque les Entérovirus sont des virus "nus" dépourvus de l'enveloppe dont sont entourés Myxovirus et Arbovirus. Peut-être faudrait-il rechercher un modèle plus proche de celui des Entérovirus dans le groupe des Adénovirus dont on sait qu'ils sont également dépourvus de lipides essentiels à leur pouvoir infectieux et qu'ils ne possèdent pas d'enveloppe.

Or, on sait, pour les Adénovirus (PEREIRA & DE FIGUEIREDO, 1962) que l'hémagglutinine est distincte de la particule infectieuse et qu'elle se présente, en microscopie électronique, comme une protéine organisée selon une architecture réalisant des formes filamenteuses ; on ne sait actuellement si ces structures correspondent à un produit de dégradation de la particule ou au contraire à des produits intermédiaires dans la replication virale. Ces résultats ont été obtenus par ultracentrifugation et, fait particulièrement intéressant, la structure de la fraction tumorigène de l'Adénovirus type 12 est très voisine de celle de l'hémagglutinine (SMITH & MELNICK, 1964). Nous n'avons malheureusement pas connaissance de travaux de séparation de l'hémagglutinine et de la particule infectieuse des Adénovirus par la méthode chromatographique, ce qui nous eut permis une utile comparaison avec nos propres résultats. Il est permis toutefois de soulever plusieurs questions sur les relations existant entre l'hémagglutinine des ECHOvirus et les autres constituants du virus.

- l'hémagglutinine est-elle représentée par une fraction nettement différente de la particule infectieuse ?

- l'hémagglutinine est-elle liée à la particule infectieuse ? Cette dernière éventualité, quoiqu'elle soit couramment répandue dans la littérature (HORSFALL & TAMM, 1965) ne nous paraît pas du tout démontrée. Nous avons même quelques raisons de croire que si une partie de l'hémagglutinine est liée à la particule infectieuse, il en est également une qui ne lui est pas attachée.

Ceci ressort des travaux d'HALPEREN (1964) où il montre, par photographie et microscopie électronique, que l'hémagglutinine correspond en grande partie à des particules vides de tout Acide Ribonucléique. Ceci est aussi net dans nos expériences sur l'ECHOvirus type 11 (souche 15.36) pour lequel, entre les deux fractions 0,1 M et 0,2 M il y a nette inversion des rapports $\frac{I}{HA}$ (877 et 0,6). Ceci n'est pas vérifié pour toutes les souches et un ECHOvirus type 6 (souche 43.18) se comporte comme si, en effet, les propriétés sont liées aux mêmes particules.

Il est difficile d'affirmer qu'il n'existe pas une hémagglutinine provenant de fragments protéiques des capsides. Elles ont pu passer inaperçues, aussi bien en chromatographie qu'en microscopie électronique vu leur petite taille et leur faible nombre. Seules des expériences sur des suspensions de virus fortement concentrées et purifiées pourraient résoudre ce problème.

Il resté donc encore un travail important à réaliser sur cette question de l'hémagglutinine des Entérovirus. Mais il est déjà manifeste qu'il peut exister des unités virales exclusivement hémagglutinantes, d'autres infectieuses et non douées de propriétés hémagglutinantes détectables par les moyens que nous avons employés ; enfin, il est également très vraisemblable qu'une fraction de la population virale peut supporter les deux caractères.

CONCLUSIONS

Après avoir rappelé l'hétérogénéité des différentes souches d'Entérovirus, hétérogénéité intratypique et même hétérogénéité de la population de particules virales d'une souche donnée, nous exposons une technique assez peu utilisée jusque-là pour les entérovirus non poliomyélitiques : la chromatographie. Nous l'avons réalisée sur colonne de phosphate de calcium, mettant ainsi au point une méthode à la fois simple et satisfaisante, pour que soit possible l'étude de nombreuses souches. L'éluant utilisé est le phosphate disodique de molarité croissante.

Cette technique nous a amenée à faire les constatations suivantes :

- 1°) - Les diagrammes d'élution de quarante quatre souches d'Entérovirus (7 ECHOvirus type 3, 10 ECHOvirus type 6, 6 ECHOvirus type 7, 11 ECHOvirus type 11, 1 ECHOvirus type 12 et 9 Coxsackievirus type B 4) montrent qu'il existe plusieurs pics d'élution correspondant à différentes molarités de l'éluant, d'où l'on peut conclure à l'existence de particules virales ayant des caractères physico-chimiques de surface différents ne correspondant pas à une différence du pouvoir cytopathogène. Mais, en l'absence d'étude *in vivo*, il n'a pas été possible de déterminer si ces particules avaient un comportement différent chez l'hôte. Ces propriétés physico-chimiques portent non sur l'acide ribonucléique infectieux, mais sur les autres constituants de la particule.
- 2°) - Si l'on compare les diagrammes d'élution des souches de Coxsackievirus B4 d'une part, et ceux des ECHOvirus type 6 d'autre part, on constate que, parmi les premiers il n'y a qu'un type de diagramme, alors que, pour les seconds, il y a des variations d'une souche à l'autre. Ces constatations laissent à penser que les populations virales sont non seulement hétérogènes quant à leurs caractères de surface, mais que la répartition quantitative de ces différentes particules est variable d'une souche de virus à l'autre.

L'étude de l'aptitude de ces différentes fractions à provoquer l'apparition d'un effet cytopathogène sur culture de cellules, jugée par la méthode des plages, n'a pas permis de mettre en évidence des différences. Le travail préliminaire effectué, visant à rechercher des différences de densité (ultracentrifugation) entre ces diverses particules, ne nous permet pas de tirer des conclusions.

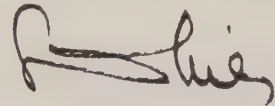
3°) - Nous avons, par ailleurs, étudié les rapports entre les modalités d'élution des particules infectieuses et celles de l'hémagglutinine. Cette étude montre que pour certains Entérovirus (1 souche d'ECHOvirus 6) le diagramme d'élution de l'hémagglutinine est superposable exactement à celui de l'élution des particules infectieuses, alors que pour d'autres (1 souche d'ECHOvirus 11) ces deux diagrammes d'élution ne sont pas superposables. La chromatographie réalise alors une séparation des deux variétés de particules ; car dans la fraction 0,1 M le rapport $\frac{I}{HA}$ du nombre de particules infectieuses (I) à celui des particules hémagglutinantes (HA) est $\frac{I}{HA} = 877$ alors qu'il est de 0,6 dans la fraction 0,2 M et de 0,77 dans le virus non chromatographié. La concentration obtenue pour l'hémagglutinine est ainsi de plus de 10^3 .

4°) - L'aspect de la courbe d'élution obtenu pour différents ECHOvirus hémagglutinants indique clairement qu'il peut exister des hémagglutinines de caractère différent, le plus souvent deux, parfois trois (ECHOvirus 3).

En conclusion, on peut affirmer que la suspension de virus obtenue à partir de liquides de culture de tissu contiennent des particules virales ayant des propriétés physico-chimiques différentes, sans que l'on puisse savoir actuellement si ces propriétés concernent des particules ayant également des propriétés biologiques différentes.

Il est également certain que dans ces mêmes suspensions virales on trouve des particules seulement infectieuses, d'autres, exclusivement hémagglutinantes. Il est également vraisemblable qu'une partie des particules est à la fois infectieuse et hémagglutinante.

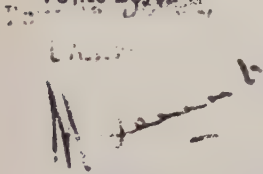
Le Président de la Thèse : Professeur R. SOHIER



VU et permis d'imprimer

LYON, le 27 Décembre 1966

VU, le Doyen :



Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,



P LOUIS

B I B L I O G R A P H I E

- ANDREWS (C.H.), (1962) :
Classification of viruses of vertebrates.
Advances virus Res., 1962, 9 , 271-296.
- BARON (S.) et LOW (R.G.), (1958) :
New maintenance medium for cell culture
Science, 1958, 128 , 89.
- BARRON (A.L.) et KARZON (D.T.), (1962) :
Bact. proc., 1962, 34
- BARRON (A.L.) et KARZON (D.T.), (1965) :
Studies of mutants of ECHOvirus 6.
I - Biologic and serologic characteristics.
Amer. Jour. Epid., 1965, 81 , 323-332.
- CHOPPIN (P.W.) et EGGERS (H.J.), (1962) :
Heterogeneity of Coxsackie B4 virus : Two kinds of particles
which differ in antibody sensitivity, growth rate, and plaque size.
Virology, 1962, 18 , 470-476.
- Comité des Entérovirus (1962) :
Classification of Human Entérovirus.
Virology, 1962, 16 , 501-504.
- Comité des Entérovirus (1963) :
Picornavirus group.
Virology, 1963, 19 , 114-116.
- DUBES (G.R.) ARCHETTI (I) et WENNER (H.A.), (1959) :
Antigenic variations among type 3 Polioviruses.
Am. J. Hyg., 1959, 70 , 91-105.

- DULBECCO (R), (1952) :

Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus.
Proc. nat. acad. Sc., 1952, 38 , 747-752.

- GAUDIN (G) BARRAL (A.M.) et SOHIER (R.), (1963) :

Hémagglutination par certains types de virus ECHO.
Ann. Inst. Pasteur, 1963, 104, 311-334.

- GORDON SMITH (C.E.) et HOLT (D.), (1961) :

Chromatography of arthropod-borne
Viruses on calcium phosphate columns.
Bull. org. mond. Santé, 1961, 24 , 749-759.

- HAAS (R.), (1963) :

Le comportement des entérovirus au cours de leur élution de
l'hydroxyde d'aluminium.
Ann. Inst. Pasteur Paris, 1963, 104, 3-25

- HALPERIN (S.) EGGERS (H.J.) et TAMM (I), (1964) :

Complete and coreless hemagglutinating particles produced in
ECHO 12 virus - infected cells.
Virology, 1964, 23, 81-89.

- HODES (H.L.) ZEPP (H.D.) AINBENDER (E.), (1960) :

A physical property as a virus marker.
Difference in avidity of cellulose resin for virulent (Mahoney)
and attenuated (L sc. 2 ab).
Strain of type 1 poliovirus.
Virology, 1960, 11 , 306-308.

- HOLLINSHEAD (A.C.), (1960) :

Differences in chromatographic behavior on cellulose columns
of virulent Mahoney and attenuated L S C strains of Poliovirus
an similarities of base ratios of their nucleic acids.
Med. exper., 1960, 2 , 303-309.

- HORSFALL (F.L.) et TAMM (I), (1965) :

Viral and rickettsial infections of Man.
ed. par J.B. LIPPINCOTT COMPANY, Philadelphie, 1965.

- HSIUNG (G.D.) et MELNICK (J.L.), (1958) :

Effect of sodium bicarbonate concentration on plaque formation of virulent and attenuated poliovirus.

J. IMMUNOL, 1958, 80 , 282-293.

- KANDA (Y.) et MELNICK (J.L.), (1959) :

IN VITRO Differentiation of virulent and attenuated polioviruses by their growth characteristics on MS cells.

J. exper. Med., 1959, 109 , 9-24.

- KARZON (D.T.) POLLOCK (B.F.), et BARRON (A.L.), (1959) :

Phase variation in ECHOvirus type 6.

Virology, 1959, 9 , 564.

- KETLER (A.) HAMPARIAN (V.V.) et HILLEMAN (M.R.), (1962) :

Characterization and classification of ECHO 28, Rhinovirus coryzavirus agents.

Proc. Soc. exper. Biol. and Med., 1962, 110 , 821-831.

- KITAWAHI (T.) FUNAHASHI (S.) and TOYOSHIMA (K), (1964) :

Purification and some antigenic properties of Measles virus hemagglutinin.

Biken Journal 1964, 6 , 253-270.

- LAHELLE (O.), (1956) :

Preparation of monolayer tissue cultures from human amniotic membranes.

Acta Path. and Microbiol. Scandinav., 1956, 39 , 338-352.

- LAHELLE (O.), (1958) :

Capacity of certain ECHOvirus 6 strains to cause hemagglutination.

Virology, 1958, 5 , 110-119.

- LWOFF (A.), (1959) :

Factors influencing the evolution of viral diseases at the cellular level and in the organism.

Bact. Rev., 1959, 23 , 109-124.

- LWOFF (A.) et LWOFF (M.), (1959) :

Remarques sur les facteurs aspécifiques gouvernant l'évolution des infections virales. La notion d'état critique.

C.R. Acad. Sc., 1959, 248 , 154-156.

- MC BRIDE (W.D.), (1962) :

Biological significance of poliovirus mutants of altered cystine requirement.

Virology, 1962, 18 , 118-129.

- MELNICK (J.L.) et RIORDAN (J.T.), (1952) :

Poliomyelitis viruses in tissues culture.

IV - Protein free nutrient media in stationary and roller tube cultures.

Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1952, 81 , 208-213.

- NICOLI (J.), (1965) :

Chromatographie sur celluloses échangeuses d'ions et gel-filtration sur agarose d'arbovirus et de produits extraits de ces arbovirus.

Ann. Institut Pasteur., 1965, 108 , 695-710.

- NORRBY (E.), (1963) :

Hemagglutination by measles virus.

III - Identification of two different hemagglutinins.

Virology, 1963, 19 , 147-157.

- PEREIRA (H.G.) et DE FIGUEIREDO (M.V.T.), (1962) :

Mechanism of hemagglutination by adenovirus types 1, 2, 4, 5 and 6.

Virology, 1962, 18 , 1-8.

- SABIN (A.B.), (1960) :

Perspect. Virology, 1960, 2 , 90.

- SALK (J.E.), (1948) :

A plastic plate for use in tests involving virus hemagglutination and other similar reactions.

Science, 1948, 108 , 749.

- SIMON (M) DOMOK (I), (1963) :

Studies on intratypic variants of ECHOviruses . Separation on hemagglutinating and no hemagglutinating.

Act. Microbiol. Acad. Sci. Hung, 1963, 10 , 293-306.

- SMITH (X.O.) et MELNICK (J.L.), (1964) :

Adenovirus-like particles from cancer induced by adenovirus 12 but free of infections virus.

Science, 1964, 145 , 1190-1192.

- SOHIER (R.), (1964) :

Diagnostic des maladies à virus.
Flammarion Ed. Paris 1964.

- SUTO (T.) KARZON (D.T.) et BUSSEL (R.H.), (1962) :

Bact. Proc. 1962, p. 135.

- SUTO (T.) KARZON (D.T.) BUSSEL (R.H.) et BARRON (A.L.), (1965, a.) :

Studies of mutants of ECHOvirus 6 .
II Isolation from human alimentary tract.
Amer. Jour. Epid., 1965, 81 , 333-340.

- SUTO (T.) KARZON (D.T.) et BUSSEL (R.H.), (1965, b.) :

Studies of mutants of ECHOvirus 6.
III Behavior in monkey and human cell culture.
Amer. Jour. Epid., 1965, 81 , 341-349 .

- TAVERNE (J.) MARSHALL (J.H.) et FULTON (F.), (1958) :

The purification and concentration of viruses and virus soluble
antigens on calcium phosphate.
J. Gen. Microbiol. 1958, 19 , 451.

- TYRREL (D.A.J.) et CHANOCK (R.M.), (1963) :

Rhinoviruses : a description.
Science 1963, 141 , 152-153.

- VOGT (M.) DULBECCO (R.) et WENNER (H.A.) :

Mutants of poliomyelitis viruses with reduced efficiency of
plating in acid medium and reduced neuro patogenicity.
Virology, 1957, 4 , 141-155.

- WALLIS (C.) et MELNICK (J.L.), (1962, a.) :

Cationic stabilization. A new property of enterovirus.
Virology 1962, 16 , 504-506.

- WALLIS (C.) MELNICK (J.L.) FERRY (G.D.) et WIMBERLY (I.L.), (1962, b.) :

An aluminium marker for the differentiation and separation of
virulent and attenuated polioviruses.
J. Exp. Med. 1962, 115 , 763-775.

- WALLIS (C.) MELNICK (J.L.) et WIMBERLY (I.L.), (1963) :

Differentiation and separation of attenuated and virulent polioviruses by adsorption to alumin salts.

Amer. J. Hyg., 1963, 77 , 250-257.

- WALLIS (C.) MELNICK (J.L.), (1965) :

Differences of cystine dependence and chromatographic behavior between two type 4 et ECHOvirus strains.

Jour. of Bact. 1965, 89 , 1310-1313.

- WANG TAI-KIANG, LI HO-MIN, HU CHUNH-HAN et CHI SHU-YUNG (1965) :

Studies on the particule constitution of measles virus hemagglutinin and standardization of hemagglutination inhibition test.

Rev. Roum. Inframicrobiol. 1965, 2 , 373-383.

- WENNER (H.A.) KAMITSUKA (P) et LENAHAHAN (M.), (1956) :

A comparative study of type 2 poliomyelitis viruses.

II Antigenic differences relating to 18 type 2 strains.

J. Immun. 1956, 77 , 220-231.

- WENNER (H.A.) ARCHETTI (I) et DUBES (G.R.), (1959) :

Antigenic variations among type 1 poliovirus. A study of 16 wild type strains and 5 variants.

Am. J. Hyg. 1959, 70 , 66-90

- WOODS (W.A.) et ROBBINS (F.C.), (1961) :

The elution properties of type 1 poliovirus from $\text{Al}(\text{OH})_3$ gel. A possible genetic attribute.

Proc. Nat. Acad. Sc., 1961, 47 , 1501-1507.

T A B L E d e s M A T I E R E S

- Introduction	1
- CHAPITRE I -	
MATERIEL ET METHODES	10
- CHAPITRE II -	
ETUDE DE L'HETEROGENEITE DES PERTICULES INFECTIEUSES des ECHOvirus type 6 et des Coxsackievirus B4	18
I - Reproductibilité de la méthode	18
II - Diagrammes d'élution des différents Virus	20
III - Tirage du pouvoir hémagglutinant	23
IV - Discussion	30
- CHAPITRE III -	
ETUDE DE L'EMAGGLUTININE	34
I - Reproductibilité de la méthode	36
II - Etude des éluats obtenus	36
III - Etude de la possibilité de modification du diagramme d'élution des Hémagglu- tinines	40
IV - Discussion	45
- CONCLUSIONS	49
- BIBLIOGRAPHIE	52

